

SÉRIE A. N° 1595

N° D'ORDRE : 2461

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

ANDRÉ ALLAIN

1^{re} Thèse. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU PHYTOPHTHORA CAMBIVORA
(morphologie, cytologie et action pathogène du parasite).

2^e Thèse. — LES CHAMPIGNONS PARASITES DE L'HOMME.

Soutenues le 14 novembre 1935 devant la Commission d'Examen.

MM. GUILLIERMOND.	<i>Président.</i>
COMBES.....	} <i>Examineurs.</i>
PLANTEFOL	

PARIS
TYPOGRAPHIE FIRMIN-DIDOT ET C^{ie}
56, rue Jacob

—
1935

SÉRIE A. N° 1595

N° D'ORDRE : 2461



THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

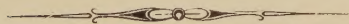
ANDRÉ ALLAIN

1^{re} Thèse. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU PHYTOPHTHORA CAMBIVORA
(morphologie, cytologie et action pathogène du parasite).

2^e Thèse. — LES CHAMPIGNONS PARASITES DE L'HOMME.

Soutenues le novembre 1935 devant la Commission d'Examen.

MM. GUILLIERMOND.	<i>Président.</i>
COMBES.....	} <i>Examineurs.</i>
PLANTEFOL	



PARIS
TYPOGRAPHIE FIRMIN-DIDOT ET C^{ie}
56, rue Jacob

—
1935



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire . . . M. MOLLIARD.
Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

Prof. honoraires. . .	{	H. LE CHATELIER.	Léon BRILLOUIN.	AUGER.
		H. LEBESGUE.	GOURSAT.	BLAISE.
		A. FERNBACH.	WALLERANT.	DANGEARD.
		A. LEDUC.	GUILLET.	JANET.
		Emile PICARD.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
		Rémy PERRIER.	FREUNDLER.	MARCHIS.

PROFESSEURS

G. BERTRAND . . . T Chimie biologique.	A. GUILLIERMOND T Botanique (P. C. B.).
M. CAULLERY . . . T Zoologie (Évolution des êtres organisés).	M. JAVILLIER . . . Chimie biologique.
G. URBAIN T Chimie générale.	L. JOLEAUD Paléontologie.
Emile BOREL . . . T Calcul des probabilités et Physique mathématique.	ROBERT-LÉVY . . . Zoologie.
Jean PERRIN . . . T Chimie physique.	F. PICARD Zoologie (Évolution des êtres organisés).
H. ABRAHAM . . . T Physique.	Henri VILLAT . . T Mécanique des fluides et applications.
E. CARTAN T Géométrie supérieure.	Ch. JACOB T Géologie.
M. MOLLIARD . . . T Physiologie végétale.	P. PASCAL T Chimie minérale.
L. LAPICQUE . . . T Physiologie générale.	M. FRÉCHET . . . T Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
E. VESSIOT T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	E. ESCLANGON . . T Astronomie.
A. COTTON T Recherches physiques.	M ^{me} RAMART-LUCAS. T Chimie organique.
J. DRACH T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	H. BÉGHIN Mécanique physique et expérimentale.
Charles FABRY . . T Enseignement de Physique.	Foch Mécanique expérimentale des fluides.
Charles PÉREZ . . T Zoologie.	PAUTHENIER . . . Physique (P. C. B.).
Léon BERTRAND . T Géologie structurale et géologie appliquée.	DE BROGLIE . . . T Théories physiques.
P. PORTIER T Physiologie comparée.	CHRÉTIEN Optique appliquée.
E. RABAUD T Biologie expérimentale.	P. JOB Chimie générale.
M. GUICHARD . . . Chimie minérale.	LABROUSTE . . . Physique du Globe.
Paul MONTEL . . . T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	PRENANT Zoologie.
P. WINTREBERT . T Anatomie et histologie comparées.	VILLEY Mécanique physique et expérimentale.
L. BLARINGHEM . T Botanique.	BOHN Zoologie (P. C. B.).
O. DUBOSCQ . . . T Biologie maritime.	COMBES Botanique.
G. JULIA T Application de l'analyse à la Géométrie.	GARNIER Calcul différentiel.
C. MAUGUIN . . . T Minéralogie.	PÉRÈS Mécanique des fluides.
A. MICHEL-LÉVY . Pétrographie.	HACKSPILL . . . Chimie (P. C. B.).
H. BÉNARD T Mécanique expérimentale des fluides.	LAUGIER Physiologie générale.
A. DENJOY T Calcul différentiel et calcul intégral.	TOUSSAINT . . . Technique Aéronautique.
L. LUTAUD T Géographie physique et Géologie dynamique.	M. CURIE Physique (P. C. B.).
Eugène BLOCH . . T Physique théorique et physique céleste.	G. RIBAUD T Hautes températures.
G. BRUHAT Physique.	CHAZY T Mécanique rationnelle.
E. DARMOIS . . . Physique.	GAULT Chimie (P. C. B.).
A. DEBIERNE . . . T Radioactivité.	CROZE Physique.
A. DUFOUR T Physique (P. C. B.).	DUPONT T Théories chimiques.
L. DUNOYER . . . Optique appliquée.	LANQUINE Géologie.
	VALIRON Mathématiques.
	BARRABÉ Géologie structurale et géologie appliquée.
	MILLOT Zoologie (P. C. B.).
	F. PERRIN Théories physiques.

Secrétaire A. PACAUD.
Secrétaire honoraire . . . D. TOMBECK.

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU PHYTOPHTHORA CAMBIVORA
MORPHOLOGIE, CYTOLOGIE
ET ACTION PATHOGÈNE DU PARASITE

INTRODUCTION

Au cours de fréquents voyages en Corrèze, il nous a été donné de constater les terribles ravages provoqués dans les châtaigneraies par la « maladie de l'Encre », dont la contagion très rapide laisse craindre l'anéantissement complet d'une des principales ressources de cette région.

*Ce mal, déterminé par l'action d'un champignon parasite, le *Phytophthora cambivora*, n'est d'ailleurs pas particulier à la Corrèze ; les autres zones forestières de France et même d'Europe sont également dévastées.*

En présence de ce qui peut être considéré comme un véritable désastre, nous avons pensé devoir, à notre tour, prendre part à la lutte engagée contre le fléau ; nous appuyant sur l'œuvre de ceux qui nous ont précédé et sur les résultats déjà acquis, nous avons porté notre examen sur les causes de la maladie, c'est-à-dire sur le champignon lui-même.

Au seuil de ce mémoire, c'est pour nous un impérieux devoir de rendre le plus sincère hommage au professeur Petri qui, en Italie, depuis plus de vingt ans, s'est adonné à cette tâche ardue et dont les découvertes sont si précieuses ; nous ne saurions non plus omettre de citer ici Dufrénoy ni de rappeler le rôle important que depuis longtemps il joue en France dans ce domaine.

Prenant pour base les travaux de ces auteurs, nous nous sommes attaché principalement aux questions qui jusqu'à présent n'avaient été qu'ébauchées ou étaient restées dans l'ombre, notamment à la cytologie de l'œuf.

Nous avons voulu ainsi apporter notre modeste contribution aux recherches déjà entreprises, avec l'espoir de fournir des éléments nouveaux à ceux qui consacrent tous leurs efforts et toute leur science à trouver à la maladie le remède qui la fera définitivement disparaître, car, il faut bien le reconnaître, les expériences effectuées à cette fin n'ont pas, jusqu'à présent, donné tous les résultats espérés.

*
* *

Pour terminer cette courte introduction, qu'il nous soit permis d'exprimer notre respectueuse et très profonde reconnaissance à notre maître, M. le Professeur Guilliermond, membre de l'Académie des Sciences, pour l'intérêt qu'il n'a pas cessé de nous témoigner, nous encourageant dans les heures de doute et nous prodiguant avec une inlassable bienveillance les conseils les plus précieux.

Nous remercions vivement M. Dufrénoy et M. Gautheret d'avoir bien voulu, en toutes circonstances, nous faire profiter de leur expérience.

Nos sentiments de gratitude vont aussi au D^r Roussel, à M. Brocq-Rousseu, membre de l'Académie de Médecine, et au D^r Bérault, pour l'hospitalité qu'ils nous ont si aimablement offerte dans leurs laboratoires, facilitant ainsi nos travaux, qu'ils ont suivis avec la plus grande attention.

Nous adressons nos remerciements à M^{me} Gruzewska dont les avis sur toutes les questions chimiques nous ont été particulièrement utiles.

M. Eichhorn, M. Szymanek, M^{lle} Delaporte nous ont rendu, à des titres divers, de réels services ; qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de nos vifs remerciements.

Enfin, M. Kaikenger, inspecteur de la reconstitution des châtaigneraies, nous a fait visiter à différentes reprises les régions les plus atteintes de la Corrèze ; nous conservons le meilleur souvenir de sa grande obligeance.

PLAN DU TRAVAIL

Le plan de ce mémoire est le suivant :

- I. *Un historique général.*
- II. *Des indications sur la technique employée.*
- III. *Une étude biologique du parasite avec description des milieux utilisés.*
- IV. *Une étude morphologique du mycélium, des sporanges, des spores et des œufs.*
- V. *Une étude cytologique comprenant la description du chondriome, des noyaux, du vacuome.*
- VI. *La recherche de l'action parasitaire du champignon sur le tissu végétal.*

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Le châtaignier subit fréquemment une infection très dangereuse qui a attiré depuis longtemps l'attention des mycologues des divers pays (France, Italie, Portugal, Allemagne, Espagne et États-Unis) et, depuis peu, celle des savants anglais.

En Italie, PUCCINELLI décrivit sommairement cette maladie pour la première fois en 1859; cependant, SELVA relata neuf ans plus tard qu'elle avait déjà été signalée dans le Piémont en 1842, que, sur le seul territoire de Graglia, il était mort environ six mille de ces arbres de 1842 à 1868 et que, depuis cette dernière année, il en mourait un millier par an. CELI en 1870 et GIBELLI, de l'Université de Modène, après lui, furent chargés par le Ministère de l'Agriculture d'Italie de rechercher les causes de la maladie. GIBELLI, aidé dans ses expériences par le chimiste ANTONELLI, en décrivit les manifestations : dépérissement lent de l'arbre accompagné d'un jaunissement du feuillage, avortement des fleurs, dessèchement progressif et chute prématurée des feuilles. Il prétendait qu'une plante atteinte mourait en trois années. Le bois du pied malade était moins dense : il pesait environ $\frac{1}{3}$ de moins que celui du pied sain; au collet et sur les grosses racines, on constatait des taches noires comme de l'encre. Les tissus

atteints étaient riches en cristaux d'acide ellagique, alors qu'il n'y en avait pas dans les tissus sains. La région corticale était plus altérée que la région ligneuse; les thylls étaient très nombreuses. GIBELLI considéra le *Diplodia Castaneæ* var. *radicicola* et le *Torula exitiosa* (probablement une forme apparentée au premier) comme les agents pathogènes de cette maladie. Toujours est-il qu'il trouva constamment sur les radicelles un revêtement mycélien ce qui, en raison de la conception d'alors sur les mycorhizes, lui donna à penser que ceux-ci étaient bien la cause du dépérissement des châtaigniers. GIBELLI signala l'apparition de la même maladie sur les noyers, mais la propagation en était beaucoup plus lente, les arbres ne se trouvant généralement pas groupés en grandes masses comme les châtaigniers.

Vers 1876, les agriculteurs français constatèrent dans les Pyrénées et dans diverses localités des Cévennes un dépérissement et une mortalité inusités des châtaigniers. La maladie était devenue épidémique, s'étendait en formant tache d'huile et s'attaquait aux arbres les plus vigoureux comme aux plus languissants, dans les sols riches, cultivés, arrosés et dans les terrains maigres et pauvres constitués par des sables granitiques. L'arbre ne se desséchait pas toujours tout d'un coup, il végétait plusieurs années, les feuilles étaient plus petites, les fruits atrophiés, puis les feuilles, les branches, le tronc, tout se desséchait. Si l'on examinait l'arbre mort ou malade, on reconnaissait que les racines étaient le siège d'une altération profonde, comparable à une gangrène humide. Le tronc, dont l'écorce se ramollissait ou même se détruisait en certains points, laissait exsuder des liquides riches en tanin, qui, se combinant au fer du sol, y formaient de l'encre, d'où les taches

noires que l'on observait sur la terre et à la surface des racines. C'est pour cette raison que DE SEYNES et PLANCHON, qui s'occupèrent de cette maladie en France, parallèlement à GIBELLI en Italie, lui donnèrent le nom de « Maladie de l'Encre ». PLANCHON attribuait le mal au parasitisme d'un *Rhizoctonia* et d'un *Agaricus* (*Armillaria mellea*).

Contrairement à GIBELLI, DE SEYNES ne put constater la présence d'un *Diplodia*, alors qu'il trouva constamment une forme de *Torula*.

CORNU pensa que la maladie avait sans doute été occasionnée par la rigueur des hivers de 1870-71 et de 1879-80. DELACROIX rappela par contre qu'après des années bien plus froides la maladie avait été bien moins répandue; il se rallia à une opinion émise par GIBELLI qui prétendait que les terrains pauvres en humus étaient favorables au développement des mycorhizes et, partant, à la maladie de l'encre : le manque de matière azotée serait donc particulièrement préjudiciable.

MALINVAUD attribua le mal au *Pseudocommis Vitis* qui déterminait la brunissure de la vigne.

CRITÉ nia que l'*Armillaria mellea* pût être cause de la maladie; il essaya de l'expliquer par un flux myco-bactérien qu'il constata dans les rameaux et qui obstruait les vaisseaux ligneux.

D'après LE GENDRE, qui s'est trouvé d'accord avec CORNU, les champignons, les bactéries ou les insectes ne s'attaquaient à l'arbre que lorsque celui-ci était endommagé par la gelée ou affaibli par la vieillesse.

MANGIN s'était intéressé depuis longtemps au dépérissement du châtaignier en France; il distinguait deux maladies différentes, l'une d'ordre physiologique, due à l'épuisement du sol, n'atteignant que les

sujets âgés et ne se transmettant pas de pied à pied; l'autre, la vraie maladie de l'encre, d'origine cryptogamique, qui attaquait seulement les racines. MANGIN prêta aussi son attention aux mycorhizes, dans lesquels il découvrit un champignon apparenté aux oomycètes, qu'il désigna sous le nom de *Mycelophagus Castaneæ*; cette opinion fut fortement combattue par DELACROIX qui estimait que les organes sporigènes appartenaient bien aux mycorhizes mêmes.

Dans le même ordre d'idée que DELACROIX, DA CAMARA PESTANA admit que la gangrène humide n'était qu'une suite du passage des mycorhizes de l'état symbiotique à l'état parasitaire, provoqué par l'insuffisance de nitrification du sol. HENRY, décrivant cette maladie aux Etats-Unis, se rangea à l'avis de DELACROIX.

Cependant SORAUER, qui ne semble pas avoir disposé d'un matériel d'étude suffisant, classa la maladie parmi celle qu'il dénommait « Lohkrankheiten »; elle était fréquente dans les terrains humides et lourds.

Pour BRIOSI et FARNETI, les altérations des racines étaient des phénomènes secondaires; la maladie débute dans la partie épigée de l'arbre par les jeunes pousses et se propageait vers le système hypogé; ils n'ont pas été sans remarquer les altérations de la région corticale et de l'appareil vasculaire. L'agent pathogène était, sous la forme conidienne, le *Coryneum perniciosum* Briosi et Farneti, et, sous la forme ascogène, le *Melanconis perniciosa* Briosi et Farneti.

GRIFFON et MAUBLANC ont repris l'étude de ce *Coryneum* et l'ont reconnu identique au *Coryneum Kunzei* var. *Castaneæ* Sacc. dont la forme ascogène était le *Melanconis Modonia* Tul. Ils ne croyaient pas qu'il pût être la cause de la maladie de l'encre.

DUCOMET et MANGIN furent du même avis. Il ne

sembla pas à ces deux botanistes que le mal fût assez étendu eu égard au grand nombre de spores que le *Coryneum* produisait. Le *Coryneum* se trouvait en outre souvent sur des pieds qui n'étaient pas atteints de la maladie de l'encre.

La maladie des châtaigniers obtenue par inoculation du *Coryneum*, le javart provoqué par le *Diplodina Castaneæ* et le cancer de l'écorce dû à l'*Endothia parasitica* présentaient tellement peu d'analogie avec la maladie de l'encre, que l'on convint de considérer cette dernière comme une maladie distincte.

En 1916, PETRI isola du cambium d'un châtaignier malade un champignon qui n'avait rien de commun avec le *Coryneum* et auquel il donna le nom de *Blepharospora cambivora*. Si certains caractères de ce champignon rappelaient ceux des Phytophthorées du moins PETRI crut-il devoir instituer cette espèce nouvelle pour les raisons suivantes : 1^o le *Blepharospora* ne produisait pas de sporanges à la surface des parties infectées des plantes ni sur les milieux solides, mais seulement dans une solution de sel minéral; 2^o le *Blepharospora* possédait de longs sporangiophores, non ramifiés, se terminant par un seul sporange.

PETRI avait remarqué un caractère particulier aux sporanges du *Blepharospora* qui consistait en ce fait que l'extrémité d'un filament pouvait, après la maturation et la libération des zoospores, former successivement plusieurs sporanges emboîtés chacun dans la paroi du prédécesseur. Il pensa que ce caractère morphologique avait sans doute une signification physiologique équivalente à la formation de plusieurs zoosporanges sur les branches d'un même filament. PETRI se rallia donc à cette opinion que la délimitation entre les diverses Phytophthorées n'était pas nettement marquée, opinion défendue par LAFFERTY et PETHY-

BRIDGE en Angleterre et par R. et E. SMITH en Amérique, qui s'occupèrent entre temps de la morphologie de ces champignons. M^{lle} BUISMAN constata, de son côté, que certains *Phytophthora* produisaient rarement des sporanges et possédaient en général des conidiophores non ramifiés comme c'était le cas pour le *Blepharospora*; il n'y avait donc pas lieu, à son avis, de laisser subsister le genre *Blepharospora* auprès du genre *Phytophthora*. C'est ce qu'admit finalement PETRI, qui classa ce parasite parmi les Phytophthorées sous le nom de *Phytophthora cambivora*.

PETRI, le premier (1925), obtint en culture pure des œufs de *Phytophthora cambivora* isolé des châtaigniers de Toscane.

Parallèlement à PETRI, DUFRÉNOY, en France, isola ce champignon des châtaigniers de Limoges, où la maladie de l'encre sévissait avec une particulière intensité. Les études de DUFRÉNOY portèrent sur les altérations tant histologiques que cytologiques déterminées par la présence du *Phytophthora cambivora* dans les tissus envahis. D'après lui, la résistance des châtaigniers importés du Japon (*Castanea crenata*) résultait, d'une part, de l'élaboration vacuolaire de tanin et, d'autre part, d'une réaction active du cambium qui formait une sorte de bourrelet cicatriciel constituant un barrage à la progression du mycélium.

Non seulement DUFRÉNOY obtint à plusieurs reprises des œufs en culture pure, mais encore put observer ceux-ci, comme PETRI d'ailleurs, dans l'axe hypocotyle des jeunes plantules de châtaigniers.

PETRI, de son côté, fut aussi frappé par la différence de résistance entre les divers châtaigniers, qu'il supposa provenir de la teneur variable en tanin. Comme la limite de tolérance du tanin en milieu de culture était très différente de celle de l'hôte (1,25 %

contre 7,10 %, 9,50 %), il abandonna cette interprétation.

En Angleterre, au cours de ces dernières années; DAY et ASHBY s'occupèrent de la même maladie; ASHBY obtint des cultures sexuées sur milieu de maïs confirmant les résultats de PETRI sur le bouillon de carottes gélosé et acidifié. De ses expériences d'inoculation, DAY conclut que les hêtres étaient plus résistants aux mêmes lignées du *Phytophthora cambivora* que les châtaigniers. Étant donnée sa polyphagie, il supposa que ce champignon s'attaquait aussi aux autres végétaux.

Tout dernièrement, différents mycologues (GRAWATT, TUCKER), tant en Amérique qu'en Europe, ont trouvé que le *Phytophthora cambivora* PETRI BUISMAN présentait beaucoup d'analogie avec le *Phytophthora Cinnamomi* Rands. FAWCET obtint de PETRI en 1930 une lignée de *Phytophthora cambivora* qui laissait apparaître des vésicules abondantes, larges et sphériques comme les chlamydospores du groupe *Cinnamomi*; les organes sexuels étaient de la même taille. Il en conclut que les deux espèces infectaient également les châtaigniers d'Italie. Les mensurations des organes sexuels du *Phytophthora Cinnamomi* ont été effectuées sur des lignées d'origines diverses : États-Unis, Italie, France, Afrique du Sud, Queensland, Porto-Rico et Java. Il a été constaté que l'anthéridie du *Phytophthora Cinnamomi* variait dans sa forme et sa dimension; elle présentait en outre, de temps en temps, des cloisons.

Récemment LABROUSSE et SARREJANNI ont étudié divers champignons du point de vue physiologique; ils ont remarqué que le *Phytophthora cambivora* acidifiait le milieu en l'amenant à un pH compris entre 3,1 et 4,2.

Ces études sur la maladie du châtaignier ont eu naturellement pour conséquence d'autres études sur les moyens de prophylaxie. C'est ainsi que GIODA relata en 1928 que GANDOLFO avait réussi par un procédé empirique — la mise à nu ou « déchaussement » de la partie de l'arbre atteinte — non seulement à enrayer, mais même à vaincre la maladie de l'encre; le procédé en question s'est depuis rapidement répandu en Italie.

En France, on emploie un moyen préventif fondé sur les principes de MANGIN; on désinfecte au sulfate de fer l'endroit où sont cultivées les plantules. En Corrèze, DUFRÉNOY préconise, pour les arbres adultes, de désinfecter le sol, soit avec du sulfate de fer, soit avec du sulfate de cuivre, soit avec de la cyanamide. Ces procédés présentent l'inconvénient d'être fort coûteux.

En dernier ressort, on a recours au remplacement des châtaigniers autochtones par des châtaigniers exotiques plus résistants, en particulier par le *Castanea crenata* du Japon (var. tamba, shiba), par le *Castanea coreiensis*, par le *Castanea mollissima*, etc. En France les châtaigniers japonais sont en général greffés avec des scions appartenant à des variétés locales réputées.

CHAPITRE II

TECHNIQUE

1^o Colorations vitales, colorations sans fixation préalable.

Le mode d'observation le plus simple est celui qui consiste à étudier le vacuome sur le vivant par la méthode des colorations vitales. Nous avons employé à cet effet le rouge neutre, le bleu de crésyl et le bleu de méthylène; le vert Janus de Hochst et le violet de dahlia ont été utilisés par nous pour la mise en évidence du chondriome. Il nous est impossible d'indiquer une concentration optimum, car les milieux différents sur lesquels le champignon a été cultivé ont une influence indéniable sur la réussite de la coloration vitale. Cependant une concentration au 1/10.000 paraît en général convenir sauf en ce qui concerne le vert Janus et le violet de dahlia qui doivent être plus dilués, 1/25.000 pour l'un, 1/50.000 pour l'autre.

Comme colorant des graisses, le bleu d'indophénol naissant a été notre réactif de prédilection; le soudan III, en solution alcoolique ou au lactophénol, ne nous a servi que pour confirmer la présence et, dans certains cas, déterminer la localisation des éléments lipoidiques.

Les modes de préparation de ces réactifs sont les suivants :

Bleu d'indophénol naissant ou Nadi. — On prépare deux solutions :

Solution aqueuse A. Chlorhydrate de diméthylparaphénylènediamine à 0,5 %.

Solution aqueuse B	{	Solution de potasse à 33 %.....	0 gr. 5
		α naphtol ou thymol.....	0 gr. 5
		eau distillée.....	100 gr.

On mélange au moment de l'emploi 1 centimètre cube de la solution A, 1 centimètre cube de la solution B et 20 centimètres cubes d'eau distillée.

Soudan III en solution alcoolique. — On dissout 1 gramme de soudan III dans 100 centimètres cubes d'alcool absolu.

Soudan III à l'acide lactique ou au lactophénol. — On dissout à chaud 0 gr. 1 de soudan III dans 100 centimètres cubes d'acide lactique ou de lactophénol.

Pour colorer à la fois les graisses et les membranes de nature callosique, nous avons employé le réactif de Guéguen qui n'est autre que du soudan III à l'acide lactique simplement additionné de :

0 gr. 1 de bleu coton C4B de Poirrier
30 gouttes de teinture d'iode.

Nous nous sommes servi à plusieurs reprises de la méthode de Guignard pour la coloration des noyaux, mais nous n'avons pas obtenu de résultats très nets. La préparation peut se faire de deux manières différentes : 1^o on mélange de la fuchsine acide et du vert de méthyle de façon que la coloration soit violette et l'on ajoute quelques gouttes d'acide acétique ; 2^o on mélange : vert de méthyle à 1 % 60 volumes, fuchsine acide à 1 % 20 volumes et quelques gouttes d'acide osmique.

On lave à l'eau. Le noyau apparaît en bleu verdâtre, le protoplasme en rouge.

2^o Coloration du matériel fixé.

A. — fixation.

La coloration directe est souvent insuffisante; il est alors indispensable de tuer le cytoplasme sans en modifier la structure cytologique; c'est ce que nous avons réalisé, d'une manière plus ou moins heureuse d'ailleurs, suivant les fixateurs mitochondriaux employés : Regaud, Meves, Nemec, Flemming faible et fort, Laguesse, Helly.

Comme fixateurs nucléaires, nous avons utilisé : Bouin, Bouin de Hollande, Stevens, Flemming fort et faible, Laguesse, Nawaschin, Helly.

En voici les formules :

<i>Regaud.</i>	Bichromate de potassium à 3 %.....	40 cc.
	Formol commercial à 40 %, neutralisé par le	
	carbonate de calcium.....	10 cc.

La fixation au Regaud demande un séjour de quatre jours dans le fixateur que l'on change à mesure qu'il se trouble; la postchromisation dans le bichromate de potassium à 3 % doit durer de cinq à six jours et même plus.

Ce fixateur conserve bien le cytoplasme et le chondriome mais, en raison de son pouvoir de fixation universelle, il ne se prête pas à l'étude exclusive du noyau.

<i>Meves.</i>	Acide osmique à 2 %.....	10 cc.
	Acide chromique à 1 %.....	30 cc.

Il faut laisser le matériel à fixer vingt-quatre heures dans le mélange et postchromiser pendant huit jours dans le bichromate de potassium à 3 %.

Le Meves est un bon fixateur des mitochondries; l'acide osmique colorant en brun noir les corps gras, soit par précipitation d'osmium métallique à leur surface, soit par la formation d'un hydrate de dioxyde Os O², il faut décolorer le matériel, soit par l'eau oxygénée, soit par le permanganate de potassium et l'acide oxalique. On verse du permanganate à 5/1000 pendant cinq minutes sur la préparation, puis on lave à l'eau. On verse ensuite de l'acide oxalique à 5/1000 pendant une minute; après quoi, on lave à l'eau courante pendant un quart d'heure.

<i>Nemec.</i>	Bichromate de potassium à 1 % ...	25 cc.
	Acide chromique à 1 %	25 cc.
	Formol à 40 %, neutralisé par le carbonate de calcium.....	4 cc.

On immerge le matériel dans le fixateur pendant vingt-quatre ou quarante-huit heures, en ayant soin de remplacer la solution toutes les douze heures par une solution fraîche; on postchromise pendant une dizaine de jours dans une solution de bichromate de potassium à 3 %.

<i>Flemming faible.</i>	Acide chromique à 1 %.....	55 cc.
	Acide osmique à 1 %.....	10 cc.
	Acide acétique cristallisable.....	10 cc.
	Eau.....	55 cc.
<i>Flemming fort.</i>	Acide chromique à 1 %.....	15 cc.
	Acide osmique à 2 %.....	4 cc.
	Acide acétique cristallisable.....	1 cc.

Le Flemming fort, tout en étant un fixateur mitochondrial, présente un intérêt de premier ordre pour les fixations nucléaires.

<i>Laguesse.</i>	Acide osmique à 2 %.....	10 cc.
	Acide chromique à 1 %	20 cc.
	Acide acétique cristallisable..	quelq. gouttes.

Le Flemming faible et le Flemming fort permettent de colorer facilement les noyaux et le chondriome en bleu, les nucléoles en rouge, le protoplasme en jaune par la triple coloration à la safranine, au violet de gentiane et à l'orange G. Nous avons aussi utilisé le Laguesse; quoique ce fixateur ne soit pas considéré comme un fixateur mitochondrial à proprement parler, nous avons obtenu de bonnes fixations du chondriome.

Pour ces fixateurs, comme d'ailleurs pour tous ceux qui sont à base d'acide osmique, il est nécessaire de blanchir les préparations par l'eau oxygénée.

<i>Helly.</i>	Bichromate de potassium	92 gr. 5
	Sublimé.....	5 gr.
	Eau.....	100 gr.

On prépare la solution à l'avance; au moment de l'emploi, on prélève 9 volumes de la liqueur et l'on y ajoute 1 volume de formol neutre à 40 %.

Pour que le chondriome soit conservé, on doit fixer au plus sept heures et postchromiser quarante-huit heures à 37° environ dans le bichromate saturé. Pour les noyaux, il faut fixer vingt-quatre heures et laver à l'eau courante sans postchromisation.

<i>Bouin.</i>	Acide picrique à saturation	15 cc.
	Formol neutre à 40 %	4 cc.
	Acide acétique cristallisable	1 cc.

Un séjour de quelques heures dans le fixateur est nécessaire; un lavage à l'alcool à 70°, renouvelé jusqu'à la disparition de la teinte jaune due à l'acide picrique, s'impose.

Le Bouin est un excellent fixateur nucléaire.

<i>Bouin de Hollande.</i>	Acide picrique	4 cc.
	Formol neutre à 40 %	10 cc.

Acide acétique cristallisable	1 cc. 50
Acétate de cuivre.....	2 cc. 50
Eau distillée.....	100 cc.

On opère comme pour le Bouin ordinaire.

<i>Stevens.</i>	Acide chromique.....	0,8 %
	Acide acétique	0,1 %

Ce fixateur a été fréquemment utilisé par ceux qui ont étudié les Péronosporées.

<i>Nawaschin.</i>	Acide chromique à 1 %	10 cc.
	Formol neutre à 40 %	4 cc.
	Acide acétique cristallisable	1 cc.

La durée de fixation est très variable, de quelques heures à quarante-huit heures.

B. — *Coloration.*

Pour colorer les coupes fixées, nous avons employé les méthodes suivantes :

Coloration à l'hématoxyline ferrique de Heidenhain.

Hématoxyline de Grüber	1 gr.
Alcool à 95°	10 cc.
Glycérine	10 cc.
Eau distillée.....	80 cc.

Cette coloration doit être précédée d'un mordantage à l'alun de fer ammoniacal à 3 % et suivie d'une différenciation avec cette même solution à 5 %.

Le nucléole est noir, le noyau gris, le protoplasme gris clair (ou rose, quand on immerge, pour obtenir une coloration de fond, les préparations dans une solution aqueuse à 0,5 % d'érythrosine pendant un temps très court).

Coloration à la fuchsine acide. — On peut préparer le réactif de deux façons différentes :

1^o Dans trois parties d'eau anilinée, une partie d'alcool à 96^o et quelques gouttes d'acide chlorhydrique, on verse de la fuchsine acide jusqu'à saturation.

2^o On dissout 2 grammes de fuchsine acide de Grüber dans 10 centimètres cubes d'eau anilinée.

Quelques heures sont nécessaires pour colorer les préparations à froid; on peut aussi couvrir la préparation de la solution colorée et la porter trois fois consécutivement sur la platine chauffante jusqu'à émission de vapeurs. On différencie ensuite pendant un temps compris entre quinze minutes et deux heures à l'aide d'une solution aqueuse à 1 % de vert lumière.

Les nucléoles, les mitochondries et les plastes sont rouges; le protoplasme est coloré en vert.

Coloration d'après la méthode d'Altmann-Küll. — Les coupes lavées sont colorées à chaud par la solution suivante :

Fuchsine acide de Grüber.....	10 gr.
Eau anilinée	100 cc.

Après lavage à l'eau distillée, on passe rapidement dans la solution :

Bleu de toluidine	0 gr. 5
Eau anilinée saturée.....	100 cc.

On différencie par une solution alcoolique d'aurantia à 0,5 %; on lave à l'alcool à 70^o et à l'eau.

Les mitochondries sont colorées en rouge et les éléments nucléaires en bleu-vert.

Triple coloration après Flemming faible (Strasburger). — On immerge de deux à quatre jours les coupes dans une solution alcoolique à 2 % de safranine mélangée avec une égale quantité d'eau anilinée. On

décolore jusqu'à ce que les traînées rouges cessent d'apparaître à l'alcool à 75° acidulé à 0,1 % d'acide chlorhydrique. Après lavage à l'alcool et à l'eau, on passe au violet de gentiane concentré aqueux pendant un temps variant de une heure à trois heures. On lave rapidement à l'eau et l'on traite par l'orange G aqueux et concentré, puis par l'alcool absolu neutre. On éclaircit enfin à l'essence de girofle ou de bergamotte.

Les noyaux et le chondriome apparaissent en bleu, les nucléoles en rouge, le protoplasme en jaune.

Coloration au bleu de Unna. — On colore pendant une heure et on différencie, soit au glycérimäthermischung, soit au tanin orange de Unna jusqu'à ce que le noyau seul reste coloré en bleu. Après lavage à l'eau et déshydratation à l'alcool absolu, on éclaircit à l'essence de girofle pendant cinq minutes.

Coloration à la thionine phéniquée. — On dissout à saturation de la thionine dans l'eau distillée, on précipite par la soude caustique à 10 %, on lave le précipité jusqu'à la disparition de la réaction alcaline. On dissout enfin le précipité dans l'eau phéniquée à 2 %. Il ne faut se servir de cette solution qu'au moins vingt-quatre heures après sa préparation.

Le noyau est coloré en rose, les nucléoles en violet, le chondriome en rouge.

Coloration à l'hémalun et à l'hématoxyline Delafield. — Après fixation d'une heure environ au Bouin et lavage dans l'alcool à 70°, on abandonne le matériel pendant une demi-heure, soit dans l'hémalun, soit dans l'hématoxyline Delafield. On lave à l'eau et l'on monte à la gélatine glycérinée.

Les noyaux sont bleus, les corpuscules métachromatiques rouges.

On obtient un résultat analogue avec le bleu de

crésyl en opérant de la même façon, mais en ayant soin de ne laisser séjourner le matériel dans la solution colorée que très peu de temps.

Nous n'insisterons pas sur le détail de la technique, tel que la préparation des inclusions, les coupes du matériel fixé, le déparaffinage, la déshydratation et le montage; ces manipulations ont été suffisamment décrites par ailleurs.

Réaction nucléale de Schiff-Feulgen. — Cette coloration, qui vient d'Allemagne, jouit à l'heure actuelle d'une grande faveur dans les laboratoires. Bien que la manipulation des réactifs soit délicate, nous avons, à différentes reprises, obtenu des résultats grâce à elle. Cependant, pour le *Phytophthora cambivora*, cette réaction ne nous a rien donné de nouveau par rapport à ce que nous avaient déjà révélé les autres fixateurs et colorants employés couramment.

La chromatine est colorée en rouge; les nucléoles restent incolores.

Nous ne décrivons ni le principe, ni le détail des opérations, le tout étant expliqué d'une façon détaillée dans le manuel de Langeron, page 1.040, édition 1934.

CHAPITRE III

ÉTUDE BIOLOGIQUE DU PARASITE

Les travaux de PETRI nous ont permis de connaître une série de milieux particulièrement favorables au développement du *Phytophthora cambivora* ; nous avons constaté par nous-même que ce champignon, bien qu'adapté à la vie parasitaire, pouvait parfaitement mener une existence saprophytique, aussi bien dans les milieux liquides que sur les milieux solides.

La polyphagie du *Phytophthora cambivora* est très remarquable : ce champignon n'a manifesté d'aversion pour aucun des nombreux milieux nutritifs solides sur lesquels nous l'avons repiqué, montrant seulement son peu d'affinité pour certains liquides à base de tanin par exemple et encore sous certaines conditions de proportions ou pour des liquides, soit par trop alcalins, soit par trop acides.

Milieux utilisés.

Les milieux nutritifs dont nous nous sommes servi pour la culture du parasite sont les suivants :

- | | | |
|------------------|---|---|
| MILIEUX SOLIDES. | { | 1 ^o Milieu au quaker-oat (de Pethybridge) à 2 % de gélose. |
| | | 2 ^o Morceau de carotte. |
| | | 3 ^o Mie de pain gélosée à 2 %. |
| | | 4 ^o Milieu aux haricots à 2 % de gélose. |
| | | 5 ^o Milieu à la pomme de terre gélosée à 2 %. |
| | | 6 ^o Milieu à la châtaigne gélosée à 2 %. |
| | | 7 ^o Morceau de zeste de citron. |
| | | 8 ^o Chaume de blé, de seigle, d'avoine. |
| | | 9 ^o Milieu à la farine de maïs gélosée à 2 %. |

MILIEUX
LIQUIDES.

- 1 0° Solution de glucose à 3 %.
- 11° Solution de glucose à 3 % peptonée à 5 %.
- 12° Solution de saccharose à 3 %.
- 13° Solution de saccharose à 3 % peptonée à 5 %.
- 14° Bouillon de viande.
- 15° Bouillon de carottes.
- 16° Gomme arabique à 30 %.

Enfin, d'autres milieux, très pauvres en aliments ou même non nutritifs, ont été utilisés, non pas pour favoriser le développement du mycélium, mais au contraire pour obtenir des reproductions par spores ou par œufs, ou bien encore pour observer les effets de ces milieux sur l'évolution morphologique du champignon. Ce sont :

- 17° Milieu à la gélose.
- 18° Milieu à la gélatine.
- 19° Milieu de terre arable et de terre argileuse.
- 20° Eau de source.
- 21° Eau de pluie.
- 22° Milieux synthétiques de Petri de diverses concentrations à l'état liquide et à l'état solide gélifié*.
- 23° Milieu au lactate d'ammonium de Petri**.
- 24° Milieu à l'asparagine de Petri***.
- 25° Milieu de Knop****.
- 26° Milieux au tanin de concentrations différentes :
0,1 % — 0,2 % — 0,5 % — 1 %.

*. Composition du milieu synthétique de Petri :

Nitrate de calcium.....	0gr.40
Sulfate de magnésium.....	0gr.15
Phosphate monopotassique.	0gr.15
Chlorure de potassium.....	0gr.06
Eau distillée.....	1000gr.

** Composition du milieu au lactate d'ammonium de Petri :

Lactate d'ammonium.....	0gr.40
Phosphate acide de potassium	0gr.15
Sulfate de magnésium.....	0gr.15
Chlorure de calcium.....	0gr.06
Eau distillée.....	1000gr.

***. Composition du milieu à l'asparagine de Petri :

Asparagine.....	10gr.
Phosphate acide de potassium	0gr.15
Sulfate de magnésium.....	0gr.15
Chlorure de potassium.....	0gr.06
Chlorure de calcium.....	0gr.01
Eau distillée.....	1000gr.

****. Composition du milieu de Knop :

Nitrate de calcium.....	1gr.
Nitrate de potassium.....	0gr.25
Phosphate monopotassique.	0gr.25
Sulfate de magnésium.....	0gr.25
Phosphate de fer.....	traces
Eau distillée.....	1000gr.

27° Milieu de la composition suivante, désigné sous le nom de milieu « A » :

Azotate d'ammonium.....	2 gr.
Sulfate de magnésium.....	1 —
Phosphate de calcium	1 —
Chlorure de sodium	0 gr. 30
Eau	1000 gr.

Nous avons aussi utilisé ce milieu nettement alcalin après adjonction d'acide malique de façon à amener son pH à 5.

28° Milieu « A » (pH = 5).

Tous les milieux ci-dessus furent stérilisés à l'autoclave à 130° pendant 45 minutes. Nos cultures furent conservées à la température de 18° environ, le plus souvent à l'abri de la lumière, sauf les cultures faites sur de la terre qui sont restées enfouies sous cloche dans un jardin où la température est descendue certains jours au-dessous de zéro.

Nous allons étudier successivement tous les milieux que nous venons d'énumérer.

1) *Quaker-oat gélosé*. — C'est un excellent milieu, peut-être le meilleur après la carotte. Le germe émet des filaments mycéliens au bout de 36 heures. Six jours après le repiquage, ces filaments sont très abondants. Si l'on attend encore 4 jours, on constate que le mycélium a envahi tout le tube. La végétation est stérile pendant longtemps, puis, au bout de 4 mois, apparaissent des œufs à anthéridie amphigyne, qui deviennent assez nombreux au bout d'une année.

2) *Morceau de carotte*. — Milieu propice par excellence au développement du *Phytophthora cambivora*. La culture offre un gazon de filaments enchevêtrés. Au bout de quelques jours, la végétation est tellement intense, que le feutrage s'insinue entre le verre et la

carotte et recouvre entièrement le milieu; le mycélium, qui est très fortement fixé au substratum, envahit même le liquide de la partie inférieure du tube. La vitalité est considérable et le champignon se conserve très longtemps.

3) *Mie de pain gélosée*. — La croissance est assez lente et le mycélium n'apparaît qu'au 5^e ou 6^e jour.

4) *Haricots gélosés*. — Ce milieu donne de bons résultats; la croissance est rapide et puissante. L'altération de la couche supérieure et son changement de teinte permettent de montrer combien est profonde la pénétration ou tout au moins l'action du champignon à l'intérieur du milieu.

5) *Pommes de terre gélosées*. — Le développement est très lent, le feutrage est ras et discontinu.

6) *Châtaignes gélosées*. — C'est un milieu presque égal au quaker-oat, avec cette différence, cependant, que la rapidité de croissance est bien moins grande dans la châtaigne. Les hyphes sont en outre moins longs et plus drus.

7) *Zeste de citron*. — En général, le milieu ne paraît pas propice à la culture du *Phytophthora cambivora*; nous sommes parvenu cependant quelques rares fois à inoculer avec succès un morceau de zeste de citron.

8) *Chaume de blé, de seigle, d'avoine*. — Nous avons groupé les chaumes des différentes graminées : blé, seigle, avoine, parce que les résultats sont les mêmes dans les trois cas; le champignon s'y développe pendant quelques jours, puis il ne tarde pas à y végéter péniblement pour disparaître au bout de 3 mois environ.

9) *Farine de maïs gélosée*. — Nous n'avons utilisé ce milieu que parce qu'il a donné des résultats intéressants pour différentes *Phytophthorées*, en parti-

culier pour le *Phytophthora Cinnamomi* de Rands; il n'en a pas été de même pour le *Phytophthora cambivora* avec lequel il est cependant en relation étroite. C'est un milieu où le développement mycélien est à peu près inexistant.

10) *Solution de glucose*. — Quatre jours après l'ensemencement, nous avons constaté un faible développement du mycélium au fond du tube; une semaine plus tard, quelques conidies étaient visibles.

11) *Solution de glucose peptonée*. — Les résultats ont été excellents; le germe déposé au fond du tube a proliféré rapidement en un grand nombre de filaments qui ne tardèrent pas à atteindre la surface libre du liquide où ils se développèrent horizontalement, produisant une sorte de manchon assez épais. On put aisément vérifier au bout de quelques jours la formation de disques superposés tels que les ont décrits CHAZE et VOLKONSKY chez les Saprologniées. Ce phénomène du « développement explosif » est d'ailleurs général dans tous les milieux liquides où la végétation est puissante : nous l'avons très souvent constaté, en particulier, dans le bouillon de carottes.

Le développement du mycélium a été tellement rapide dans ce milieu peptoné que nous avons été conduits à calculer l'augmentation de poids sec qui résultait de l'emploi des peptones par rapport aux milieux qui n'en contenaient pas; nous avons à cet effet versé dans un certain nombre de tubes de l'eau stérilisée, une solution de glucose à 3 %, une solution de saccharose à 3 %, d'une part, et, dans d'autres tubes, un égal volume des mêmes liquides, mais peptonés à 5 %, d'autre part. Nous avonsensemencé tous ces tubes avec un même poids de mycélium de *Phytophthora cambivora*. Douze jours plus tard, nous avons procédé aux pesées; le résultat a été le suivant :

l'augmentation de poids sec a été de 2 à 10 fois plus grande dans les milieux peptonés que dans ceux qui ne l'étaient pas.

12) *Solution de saccharose.* — Les filaments nouveaux apparaissent 48 heures après l'ensemencement. C'est un milieu qui convient bien à la culture du *Phytophthora cambivora*.

13) *Solution de saccharose peptonée.* — Le développement dans la solution au saccharose peptonée est à peu près semblable au développement dans la solution au glucose peptonée.

14) *Bouillon de viande.* — Le mycélium se développe péniblement 10 jours après l'ensemencement; de nombreux bourgeonnements sont visibles quelques jours plus tard.

15) *Bouillon de carottes.* — Les nouveaux filaments mycéliens apparaissent très vite; la croissance en est très rapide. Nous avons cherché à savoir si le mycélium pouvait prospérer dans un milieu isolé de l'air extérieur; à cet effet, nous avons employé des tubes sous vide scellés, ou des tubes de bouillon dont la surface libre était recouverte, soit de sulfure de carbone, soit d'huile de vaseline. Dans les trois cas, le mycélium a envahi rapidement et complètement ce milieu liquide.

16) *Gomme arabique.* — La gomme arabique, en solution à 30 % dans l'eau distillée, est un médiocre milieu : les fines ramifications du mycélium montent rapidement à la surface du liquide où elles se développent horizontalement.

17) *Milieu à la gélose.* — Le mycélium dépérit au bout d'une dizaine de jours; des ensemencements profonds dans la gélose au 1/4 ainsi que dans la gélose Veillon ont démontré la nature anaérobie du champignon.

18) *Milieu à la gélatine.* — On peut répéter pour la gélatine ce qui a été dit à l'occasion de la gélose.

19) *Terre arable et terre argileuse.* — Les cultures pures sur de la terre ont été déjà réalisées par plusieurs auteurs. Nos essais de culture ont été effectués de la manière suivante : des tubes d'une longueur de 35 centimètres et d'un diamètre de 5 centimètres, ouverts aux deux extrémités, ont été emplis l'un d'une terre légère, l'autre de terre argileuse, les ouvertures étant fermées par des tampons de coton. Les tubes ainsi préparés ont été stérilisés à plusieurs reprises au four Pasteur à 180°, humidifiés à nouveau aseptiquement avec de l'eau stérile, puis stérilisés deux fois à l'autoclave à 130° pendant 45 minutes.

Nous avons déposé dans cette terre un petit fragment de carotte ou un peu de purée de châtaigne gélosée avec la culture pure de *Phytophthora cambivora*. Les tubes furent gardés dans un jardin, enfouis dans la terre à une profondeur d'environ 15 centimètres, recouverts d'une cloche. Ces tubes furent examinés fréquemment. Le feutrage du mycélium se répandit assez vite à la surface de la terre aussi bien dans un cas que dans l'autre. L'examen microscopique, fait deux mois après le début de l'expérience, ne nous révéla rien de bien particulier en ce qui concerne la terre arable, sinon une tendance plus ou moins marquée à la formation d'oogones, mais, par contre, nous permit de déceler la présence très nette d'oogones et d'œufs au milieu d'un mycélium vide et irrégulier dans la terre argileuse. Dans ces deux terres, nous pûmes constater, deux mois plus tard, au cours d'un nouvel examen, la formation de sporanges et de conidies sans conidiophore, qui seront décrites plus loin au cours de notre étude morphologique. Nous avons ainsi rétabli par l'expérience le phénomène qui, dans

la nature, se produit vraisemblablement sur l'humus du sol. La contamination des châtaigneraies est certainement due à l'entraînement, par les eaux de ruissellement, des zoospores libérées.

Malheureusement, l'expérience ne put être prolongée davantage, les tubes, malgré les précautions prises, ayant été contaminés par divers parasites végétaux ou animaux (anguillules).

20) *Eau de source*. — Le développement est assez lent; au bout de 2 mois environ le mycélium bourgeonne intensément.

21) *Eau de pluie*. — Ce milieu n'est guère favorable au parasite.

22) *Milieux de Petri liquides et gélosé*. — Les filaments très fins, d'abord cylindriques, deviennent variqueux au bout d'un mois; nous avons constaté bien souvent dans ces milieux liquides la présence de sporanges, d'oogones et de corps intercalaires. Comme nous le verrons plus loin, le milieu de Petri gélosé nous a permis d'obtenir, dans certaines conditions, des œufs en très grande quantité.

23 et 24) *Milieux au lactate d'ammonium et à l'asparagine*. — Ces milieux indiqués par Petri nous ont donné des renflements du mycélium, produisant de nombreux tubes germinatifs.

25) *Milieu de Knop*. — Ce milieu est très propice à la formation des conidies.

26) *Milieux au tanin*. — Le champignon vit dans une solution au tanin à 0,1 % ou 0,2 %, rarement dans une solution à 0,5 %, jamais directement dans une solution à 1 %. Cependant nous sommes arrivés à obtenir un développement du mycélium dans une solution à 1 % à condition toutefois de l'avoir fait séjourner quelque temps au préalable dans des solutions de concentration inférieure. Cette concentration

de 1 % constitue une limite; nous sommes donc en accord avec Petri qui considère comme mortelle, dans certaines conditions spéciales il est vrai, la concentration de 1,25 %.

27) *Milieu « A »*. — Ce milieu nous a donné des résultats très intéressants. Il nous a permis de voir le mycélium sous les formes les plus diverses, d'obtenir des conidies de toutes sortes et même des œufs.

28) *Milieu « A »* ($pH = 5$). — Les filaments y sont larges; le protoplasme dense contient peu de graisses.

CHAPITRE IV

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE

Si le développement du champignon, du point de vue quantitatif, peut être réellement considéré comme dépendant du milieu, les formes du parasite, au contraire, ne semblent pas être liées essentiellement à la composition de celui-ci.

Reprenant les travaux de PETRI sur les milieux qu'il a composés, il nous a paru que les modifications attribuées par cet auteur à l'influence de tel ou tel milieu n'étaient pas dues tant à ces milieux qu'à l'action combinée d'autres facteurs extrinsèques et de facteurs inhérents à la nature même du champignon.

1^o Mycélium.

Le mycélium, dont la forme a déjà été plusieurs fois décrite, est régulier, cylindrique, ramifié quand il se développe sur un milieu nutritif qui lui convient, mais les diamètres des hyphes sont de dimensions tout à fait variables. Ce cas simple est d'ailleurs rare et le mycélium se présente d'ordinaire sous les formes les plus diverses. Souvent il a tendance à se dilater en certains points (Pl. I, Fig. I) ou à produire sur une partie de sa longueur des bourgeonnements nombreux à intervalles plus ou moins réguliers (Pl. I, Fig. 2); ce dernier état, dans lequel le mycélium est de dimensions normales mais recouvert de nombreux

bourgeoisements, est aussi fréquent dans le milieu « A » que dans le milieu au lactate d'ammonium. Sur la carotte, dans la partie liquide située au fond du tube de culture, le mycélium présente un aspect palmé et variqueux (Pl. I, Fig. 3) en opposition avec les hyphes aériens, réguliers, cylindriques et peu ramifiés de la partie solide. Fréquemment, sur milieu de Petri en particulier, on trouve une germination en filaments partant tous d'un même point à aspect

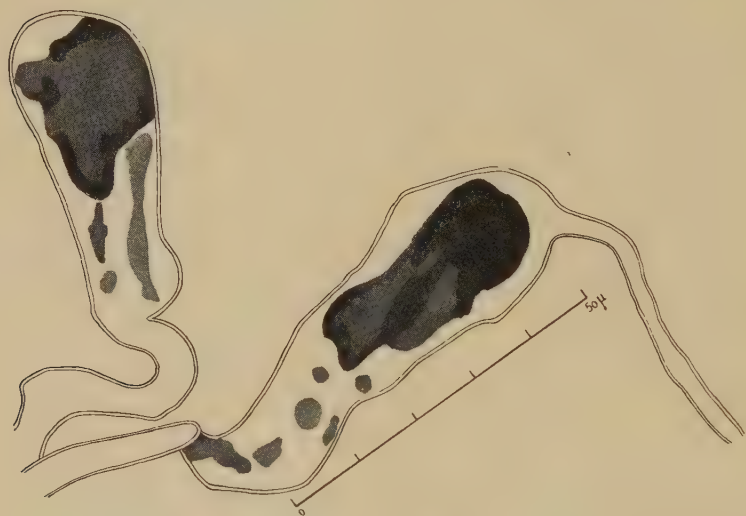


FIG. 1. — Renflements du mycélium riches en graisses.

verticillé, mais ces filaments sont beaucoup plus fins que l'hyphe sur lequel ils ont pris naissance (Pl. I, Fig. 4). La dilatation du mycélium, que nous avons déjà fait remarquer, prend quelquefois une extension considérable, formant de véritables ampoules très riches en graisses (Pl. I, Fig. 5 et 6); ces ampoules se rencontrent souvent et en abondance d'autant plus grande que le milieu est plus nutritif, mais il y a des exceptions et nous avons pu consta-

ter dans des milieux synthétiques minéraux des renflements plus ou moins enchevêtrés (Fig. 1 et 2).



FIG. 2. — Mycélium : renflements (*a* et *b*) successifs réniformes paraissant se différencier en éléments sexuels (*c*); germination d'un de ces renflements (*d*).

Parmi eux il faut distinguer : 1^o ceux qui ont une tendance à produire des organes de repos fixés sur une



FIG. 3-4. — Étranglements (*a*) du mycélium et formation d'éléments ayant tendance à s'individualiser.

partie étranglée du mycélium (Fig. 3); parfois ces organes s'hypertrophient et prennent une forme plus

ou moins digitée (Fig. 4); 2^o ceux qui ont constitué des organes spéciaux ayant le caractère d'un corps intercalaire, tel le renflement (Pl. I, Fig. 7) né sur un thalle régulièrement cylindrique. Ce corps, de forme sphérique, germe à son tour, les tubes germinatifs en *a* s'étant manifestés postérieurement à l'apparition des renflements du mycélium en *b*. Ces élargissements du mycélium (Fig. 2) semblent aussi se différencier en oogones (*a*) et anthéridies (*b*) si l'on doit accepter l'appendice visible en *c* comme un tube fécondateur, mais c'est là une opinion que nous émettons sous les plus expresses réserves. D'autre part, ces ébauches d'oogones peuvent germer directement comme c'est le cas en *d*. Enfin les renflements apicaux peuvent s'identifier avec des conidies comme nous l'avons remarqué dans les figures 7 *c* et 8 de la planche I. La figure 9, planche I, révèle nettement le phénomène de germination directe d'un sporange avorté qui d'ailleurs peut aussi bien être considéré comme un corps intercalaire.

Vivant, le mycélium ne présente pas de cloisons, mais, comme nous l'avons observé, celles-ci apparaissent à mesure que le protoplasme se contracte; ainsi toute la partie du thalle vidé est pourvue de séparations plus ou moins rapprochées dites cicatricielles, telles qu'elles furent constatées chez le *Phytophthora infestans*. Ces cloisons cicatricielles se rencontrent non seulement dans les mycéliums réguliers ou renflés quand le protoplasme se retire, mais aussi lorsqu'il y a tendance à l'individualisation d'un ou de plusieurs fragments de ce protoplasme. Sans attribuer un effet exclusif au milieu « A », nous soulignons que ce phénomène a été observé bien plus souvent par nous dans ce milieu que dans d'autres.

Les cloisons peuvent être complètes ou inachevées,

disposées perpendiculairement aux parois ou non, bien que ce dernier cas soit très rare (Pl. II, Fig. 1). Le mycélium germe souvent, soit en poussant des prolongements à travers une cloison (Pl. IV, Fig. 1) ou même plusieurs cloisons consécutives (Pl. IV, Fig. 2), soit en formant directement sur la cloison une conidie (Pl. II, Fig. 2); c'est là, hâtons-nous de le dire, un cas exceptionnel.

Le protoplasme, enfermé entre deux cloisons, peut d'autre part s'échapper en rompant la paroi mycélienne, ce qui n'équivaut cependant pas à une germination ou à un bourgeonnement. Dans le cas de la germination, en effet, il y a continuité de la membrane du mycélium primaire, tandis qu'ici la membrane se forme aux dépens du protoplasme libéré (Pl. IV, Fig. 3 et 4). L'évacuation à l'extérieur est très nette sur la figure 5, planche IV, où le protoplasme n'a pas perforé la paroi, mais a rompu son ancienne enveloppe au niveau de la cloison. Le protoplasme émis s'entoure d'une nouvelle membrane et continue sa croissance.

Souvent, le protoplasme se divise à l'intérieur du thalle et la formation des membranes qui assure la conservation de l'élément se fait autour des particules individualisées quelles qu'en soient les dimensions (Pl. IV, Fig. 6 et 7). L'accumulation de ces particules provoque quelquefois un renflement apparent du mycélium (Pl. IV, Fig. 8). Elles peuvent ou bien germer en perforant le thalle (Pl. IV, Fig. 9) et pousser quelquefois des prolongements très longs (Pl. IV, Fig. 10) ou bien germer à l'intérieur du thalle (Pl. IV, Fig. 11) ou bien encore germer une fois expulsées de celui-ci (Pl. IV, Fig. 12 et 13). Des phénomènes identiques ont été observés dans les cultures en milieu de Petri et sur la carotte.

Dans la gomme arabique, le mycélium régulière-

ment cylindrique apparaît sous une forme modifiée; les filaments nouveaux, provenant de la germination intramycélienne du protoplasme, sont très ténus et recouverts parfois de petits bourgeons; ces filaments sont plus aptes à perforer les cloisons que la paroi.

Si ce mode élémentaire de propagation n'est pas un effet du vieillissement du mycélium, il nous suggère l'affinité du *Phytophthora* avec les Saprolégniées.

En nous documentant, nous avons trouvé que CHAZE, en 1925, avait constaté un phénomène analogue chez les Saprolégniées cultivées sur le milieu de Gorodkova (eau pure 1.000 gr., gélose 1 gr., peptone 1 gr., bouillon de viande 1 gr., chlorure de sodium 0 gr. 50, glucose 0 gr. 25). Déjà, en 1900, quelques notes émanant du laboratoire de Carlsberg avaient paru sur le même sujet. On a donné à ce phénomène qui a été signalé chez un grand nombre de champignons le nom d'« accroissement perforant ». Certains auteurs l'ont attribué à la plasmolyse, d'autres à l'appauvrissement du protoplasme dû au manque d'aliment.

L'analogie du phénomène relaté dans les travaux du laboratoire de Carlsberg avec celui que nous avons constaté n'existerait que dans le cas où il y a perforation. Il nous est impossible d'assimiler les particules protoplasmiques individualisées aux endospores de Weleminsky ou aux conidies de Klöcker et Shiönning. D'après les caractères généraux du *Phytophthora cam-bivora*, qui ne possède pas de thalle cloisonné, ces propagules doivent être considérées comme des cénocytes composés d'unités physiologiques (énergides) à pouvoir germinatif, dont le nombre varie suivant leurs dimensions.

A notre avis, si le cloisonnement est un symptôme de vieillissement et d'arrêt de croissance, la reprise

de vitalité ne peut s'expliquer que comme une conséquence d'une adaptation aux nouvelles conditions du milieu.

Les filaments dont le protoplasme a disparu contiennent souvent des gouttelettes graisseuses en plus ou moins grande quantité (Pl. IV, Fig. 14). Dans ce cas, il faut donc porter une particulière attention à l'examen pour ne pas être exposé à conclure de la présence de celles-ci à l'existence d'un protoplasme fragmenté, qui, malgré les apparences, est de nature toute différente.

2° Sporangies et Conidies.

Comme nous l'indiquons dans la description des milieux, les conidies apparaissent plus abondamment dans le milieu de Petri que dans d'autres, mais nous n'avons pas constaté que tel ou tel milieu, en dehors de celui-là et peut-être des milieux « A » et de Knop, soit particulièrement favorable à la production des conidies.

Le sporangie est dépourvu de papille; il est généra-

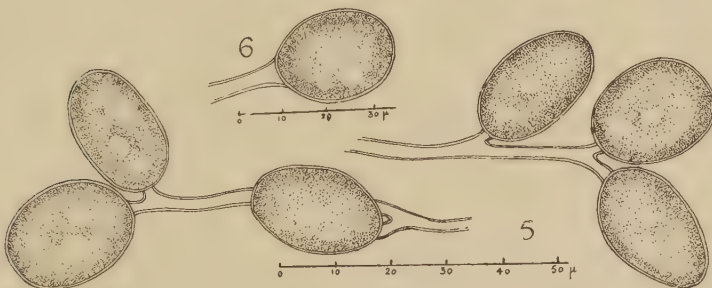


FIG. 5. — Sporangies nés sur un même thalle.

FIG. 6. — Sporangie de forme presque sphérique.

lement situé seul à l'extrémité d'un filament, mais, contrairement à l'opinion de PETRI, peut faire quel-

quefois partie d'un groupe dont chacun des éléments est rattaché par un court pédicelle à l'hyphe principale (Fig. 5). Sa forme est généralement ovoïde, mais elle est aussi parfois presque sphérique (Fig. 6). L'instabilité morphologique que nous avons signalée pour le mycélium n'est pas moins accentuée en ce qui concerne les conidies, dont les dimensions sont aussi très variables.

Ce qui constitue le caractère spécifique du *Phytophthora cambivora*, c'est un sporange à pédicelle à la suite duquel se développe un sporangiophore secondaire porteur lui-même d'un nouveau sporange : c'est ainsi que plusieurs sporanges apparaissent successivement sur le même mycélium à intervalles plus ou moins rapprochés. Le filament qui a formé un premier sporange peut, après la maturation et la libération des zoospores ou du protoplasme, continuer de croître et former un deuxième, puis un troisième sporange et souvent une série de sporanges, chacun étant emboîté entre les parois de son prédécesseur (Pl. III, Fig. 1). Nous avons observé en chambre de Van Tieghem, très rarement il est vrai, un sporange né à l'intérieur d'un sporange plus ancien sans que ce dernier ait déversé à l'extérieur son contenu. Dans le cas de la planche III, figure 2, les deux sporanges sont visibles, mais les spores ne le sont pas, tandis que, dans le cas de la planche III, figure 3, le protoplasme du sporange intérieur semble s'être différencié en spores.

Nous avons constaté la présence fréquente de conidies à conidiophore presque nul que nous avons désignées sous le nom de « conidies sessiles »; elles peuvent se former sur un thalle les unes à côté des autres (Pl. II, Fig. 3; Fig. 7). Tout en conservant le mode de dispositions successives indiqué plus haut, les conidies

sessiles peuvent donner à leur tour naissance à des conidies secondaires et tertiaires sessiles, chacune



FIG. 7. — Germinations de conidies sessiles.
(Gouttelettes de graisses en noir.)

étant délimitée ou non par des cloisons (Pl. I, Fig. 10, et Pl. II, Fig. 4).

Il arrive qu'une conidie sessile germe et produise un sporangiophore à l'extrémité duquel se forme un sporange, qui, différencié en zoospores, se vide; le sporangiophore continue ensuite son développement (Pl. III, Fig. 4). C'est là un cas d'alternance de la formation des conidies sessiles et des conidies pédi-cellées ou vice-versa (Pl. I, Fig. 11). Comme le représente cette dernière figure, la différenciation en conidies peut s'arrêter en cours de développement, et au lieu d'assister à la germination de la conidie secondaire, nous remarquons que la conidie primaire prolifère directement en un nouvel hyphe; ces deux conidies ont tendance à s'individualiser sans cependant qu'il y ait entre elles formation de cloisons. Les conidies sessiles peuvent se détacher du thalle et entrer en germination (Pl. II, Fig. 5-6). C'est aussi le cas de la planche I, figure 12, dans lequel la conidie, après avoir donné naissance à un premier hyphe qui s'est arrêté en cours de développement,

a pu produire plus tard un second hyphe ayant le même point de départ que le premier.

Les conidies à forme classique sont souvent pourvues d'un sporangiophore nettement différencié atteignant quelquefois une très grande longueur; le sporangiophore secondaire peut s'allonger aussi considérablement sans la moindre déformation du mycélium pour donner enfin une nouvelle conidie (Pl. III, Fig. 5). D'autre part, nous avons quelquefois constaté un arrêt du développement de la conidie secondaire formée à l'intérieur de l'enveloppe même du sporange primaire; cette conidie, logée dans le conidiothèque rémanent, continue sa prolifération directe en un hyphe normal (Pl. III, Fig. 6). Quand le sporange s'arrête en cours de différenciation, il arrive que son sporangiophore germe directement au point d'attache de la conidie à son support ou un peu au dessous (Pl. II, Fig. 7).

Contrairement au cas le plus général, le sporange, sans se différencier en spores, germe parfois directement, soit par son extrémité apicale (Pl. II, Fig. 8), soit par sa base (Pl. II, Fig. 9). Il arrive aussi que le protoplasme soit expulsé sans formation préalable de spores (Pl. II, Fig. 10). Quand le protoplasme reste dans le sporange, le sporangiophore continue son développement normal, comme le montre la planche II, figure 11, ou se prolonge en un tube germinatif au travers du contenu résiduel du sporange (Pl. II, Fig. 12).

Nous avons comparé les sporanges du *Phytophthora cambivora* avec ceux d'espèces voisines : les dimensions sont à peu près les mêmes, les formes aussi. Beaucoup de sporanges, comme ceux du *Phytophthora Cactorum* et du *Phytophthora terrestris* (Fig. 8 a-b), possèdent des papilles; le sporange du *Phytophthora erythrosepica*

(Fig. 8 c) n'en a pas et par ce fait même présente une grande analogie avec celui du *Phytophthora cambivora*.

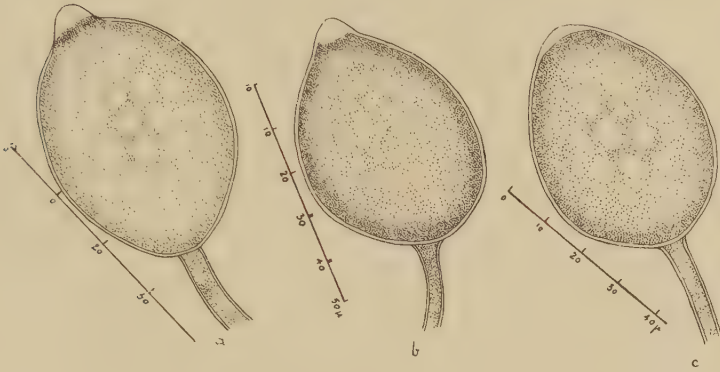


FIG. 8. — Sporangies de Phytophthorées.

a) *Phytophthora Cactorum*; b) *Phytophthora terrestris*; c) *Phytophthora erythroseptica*.

A. *Formation des Zoospores.* — C'est dans les milieux liquides, sous une très faible épaisseur, qu'apparaissent le plus facilement les sporanges; cependant nous avons constaté la présence de ceux-ci sur des milieux gélosés, peu ou non nutritifs (milieu de Petri gélosé), surtout quand les milieux sont recouverts d'une mince couche d'eau de condensation. La méthode préconisée par PETRI donne de très bons résultats; elle consiste, pour l'obtention des sporanges, à placer pendant quelques jours une petite quantité de mycélium dans un flacon à fond plat contenant une mince couche de milieu de Petri, et, pour la formation des spores, à transporter ce mycélium dans un autre flacon où l'on a préalablement versé une couche de 1 millimètre au plus d'eau distillée. Néanmoins les spores ne prennent pas toujours naissance, et les sporanges, dans ce cas, germent directement; pour notre part, nous pensons que l'emploi de l'eau de

source est préférable à celui de l'eau distillée. Il est bon de conserver les flacons à l'obscurité pour éviter l'éclatement prématuré de sporanges; la lumière en effet joue un rôle important dans la libération des spores.

PETRI relate, dans son étude du parasite, que le contenu du sporange se différencie en vingt spores en partie ciliées mobiles et en partie non ciliées immobiles. Nos observations directes sur le champignon cultivé en chambre de Van Tieghem, milieu de Petri, nous ont donné des résultats différents quant au nombre des spores, au mode de différenciation du protoplasme et aux caractères des zoospores.

Sur la planche III, figure 7, nous reproduisons le détail d'une expérience à laquelle nous nous sommes livré *in vivo*. Nous avons vu un sporange contenant encore son protoplasme, différencié distinctement en zoospores. Environ quinze minutes plus tard, nous avons assisté à la libération de ces spores de dimensions variables sans cils visibles et animés d'un rapide mouvement de rotation. Témoins de l'éclatement du sporange depuis le début de l'évacuation jusqu'à l'expulsion complète, il nous a été permis de déterminer le nombre de zoospores : dix exactement. Frappante est la différence entre le volume total des zoospores une fois expulsées et celui du zoosporange encore intact : il y a là une preuve de dilatation très nette de ces spores après la déhiscence du sporange, ce que nous avons constaté du reste *in vitro*. Quelques-unes de ces zoospores, après s'être enflées, ont éclaté et se sont dissociées en très petites particules protoplasmiques.

La différence entre le nombre des zoospores observé par PETRI et celui que nous avons reconnu nous-même peut s'expliquer par la différence de leurs dimensions;

ces zoospores sont parfois jumelées, tout en conservant d'ailleurs leur motilité (Pl. III, Fig. 8).

L'instabilité du nombre des spores doit dépendre en plus de ce que la différenciation incomplète du protoplasme en zoospores est très fréquente : il arrive en effet qu'une partie seulement donne naissance à des zoospores, l'autre étant expulsée directement et se désagrégeant (Pl. III, Fig. 9). Toutes les zoospores ne sont pas expulsées avant de germer; c'est ce cas que nous avons pu constater à l'intérieur de l'enveloppe, le sporangiophore ayant continué son développement en traversant la masse protoplasmique non différenciée.

B. Description des Zoospores. — Nous avons observé les spores avec un microscope à fond noir tout de suite après leur expulsion du sporange; elles ne sont pas réniformes, mais elles constituent une masse qui s'étire en deux pointes opposées l'une à l'autre et de chacune desquelles part un cil vibratile. Ces deux cils sont d'inégale longueur (Pl. III, Fig. 10 *a*); en raison de leur finesse et de l'extrême vitesse de leur mouvement, nous avons été obligé, pour les observer, de faire baigner les spores dans un liquide visqueux. Nous avons remarqué alors que la zoospore, animée d'un mouvement de rotation immédiatement après son expulsion, se dirigeait ensuite toujours dans le même sens, le cil vibratile le plus court étant en avant et servant, semble-t-il, de gouvernail; l'autre cil très long se déplace rapidement de façon à servir d'organe de propulsion. Cette spore, qui laisse voir même sans aucune coloration un gros noyau central, se déplace en ligne droite, puis d'un seul coup change complètement de direction et repart de nouveau en ligne droite, parcourant ainsi une ligne brisée.

Au bout de quelque temps, les cils tombent et la

spore a tendance à s'arrondir (Pl. III, Fig. 10 *b*) en passant par différents stades, tel celui de la planche III, figure 8*b*, où nous ne voyons plus qu'un seul allongement protoplasmique sur une spore située encore dans son sporange.

Nous avons examiné les spores dans un liquide visqueux parce que la méthode de LOEFFLER ne nous a pas donné les résultats que nous en attendions en raison de ce fait que le chauffage pour la dessiccation de la culture provoque la rupture entre le cil et la spore et rend ainsi l'observation complète pratiquement impossible.

Tantôt les spores germent directement, tantôt elles s'entourent d'une membrane pour germer ultérieurement quand le milieu devient favorable (Pl. III, Fig. 10*c* et *d*). Les vacuoles apparaissent dans les spores libérées, mais il est des cas (Pl. III, Fig. 11) où de grosses vacuoles sont visibles dans des spores encore situées dans le sporange.

3^o Corps intercalaires.

Comme nous l'avons vu précédemment (Pl. I, Fig. 7), les corps intercalaires prennent quelquefois naissance sur un mycélium absolument régulier et ceci aussi bien sur des milieux nutritifs (quaker-oat) que dans des milieux synthétiques minéraux (milieu de Knop, milieu de Petri); néanmoins, parmi ces derniers, le milieu de Petri siliceux nous a permis d'obtenir une production plus importante de corps intercalaires. Ces corps ne peuvent pas être confondus avec les conidies en raison de leur taille et de leur forme complètement sphérique. Sur la figure 9, nous voyons l'un d'eux bourré de graisses, comme le filament qui y fait suite et se termine par un sporange vide.

Sur la figure 10, nous avons l'exemple de plusieurs corps intercalaires successifs; le dernier donne naissance à un sporange dont le contenu protoplasmique s'échappe sans se différencier en spores. Ce sont des formations



FIG. 9-10. — Corps intercalaires.

analogues que nous constatons sur la planche XIV, figure 1.

Ces corps ont une grande analogie avec les vési-



FIG. 11. — Chlamydospore de *Phytophthora terrestris*.

cules du *Phytophthora Cinnamomi*, à cette différence près cependant que le nombre en est très inférieur dans le *Phytophthora cambivora* que nous avons étudié et dont les souches ont été recueillies aussi bien sur des châtaigniers de Bretagne que de Gironde et d'Italie.

Malgré les apparences, ces corps ne peuvent pas

être considérés comme des chlamydospores — c'est le cas pour le *Phytophthora terrestris* (Fig. 11) — du fait que la membrane n'est pas plus épaisse que dans le mycélium environnant; néanmoins, ils se rapprochent plus des chlamydospores que — nous le répétons — des conidies ou des sporanges, qui ont des caractères différents. Il n'y a qu'un cas où nous avons pu constater des corps intercalaires à membrane épaissie, c'est celui que nous allons décrire au paragraphe suivant, mais qui, à proprement parler, ne constitue pas un cas particulier puisqu'il intéresse également le mycélium, les spores, etc...

Chez le *Phytophthora erythrosepica* les corps inter-

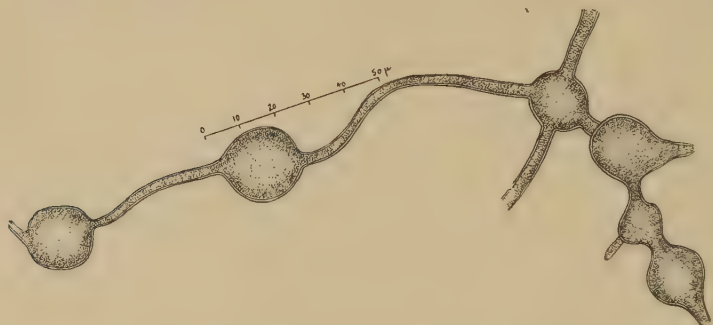


FIG. 12. — Corps intercalaires dans le *Phytophthora erythrosepica*.

calaires (Fig. 12) se présentent exactement de la même façon que sur les dessins des figures 9 et 10, nouvelle ressemblance entre ce champignon et le *Phytophthora cambivora*, que nous tenons à signaler.

4° Observations microchimiques sur les épaissements du Mycélium.

La constitution chimique des membranes de champignons a déjà été l'objet de nombreux travaux.

La plus importante contribution à cette question a été apportée par MANGIN dans son étude sur les Péro-nosporées et les Mucorinées; les parois mycéliennes, d'après cet auteur, se composeraient principalement de callose, produit amorphe, incolore, insoluble dans l'eau froide, résistant à l'action de la solution de Schweitzer ou solution cuproammoniacale, même après traitement par un hydrolysant tel que l'acide sulfurique, le chlorure de zinc, la potasse ou la soude caustique. Sous l'influence des carbonates alcalins ou de l'ammoniaque, la callose se gonflerait ou deviendrait gélatineuse sans subir de dissolution.

Selon son degré de polymérisation, MANGIN distingua pour la callose deux états physico-chimiques, le premier permettant une coloration sans traitement préalable, le second permettant une coloration après un traitement préparatoire; à cette fin, il utilisa comme réactif l'acide nitrique, et, comme colorants, le bleu de coton, le bleu d'aniline et la coralline; il employa en plus l'orseilline B et le brun vésuvien, qui sont des colorants cellulosiques, afin de révéler l'association de corps différents (callose et cellulose). MANGIN identifia la callose des champignons à la matière entrant dans la composition des callosités des vaisseaux libériens chez les phanérogames. Pour VON MOOR, ces callosités seraient constituées principalement de protéines, alors que MOLISCH soutenait une opinion contraire, n'ayant jamais pu vérifier la présence de ces substances dans les plantes supérieures.

D'autres auteurs et parmi eux DE BARY ont constaté que l'iodure de potassium colorait quelquefois directement les membranes de champignons en bleu, mais le plus souvent en jaune ou brun. DE BARY fut ainsi amené à proposer comme constituant de la

membrane une substance à laquelle il donna le nom de « Pilzcellulose ».

RICHTER, désireux de pousser la discrimination plus loin, ne put se résoudre à se prononcer qu'après un traitement préalable à la potasse pour débarrasser des protéines le matériel à l'étude; ces protéines, en effet, risquaient de fausser les résultats en raison de ce fait qu'elles se coloraient en brun sous l'action de l'iode; il espérait aussi pouvoir prouver que les champignons ne contenaient pas d'autre cellulose que la cellulose ordinaire.

D'après GILSON, WINTERSTEIN, IVANOFF et WISSELINGH, les champignons qui ne donnaient pas directement une réaction cellulosique ne contenaient ni « Pilzcellulose » ni cellulose ordinaire, mais de la chitine, produit insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques; cette substance était attaquée par l'acide sulfurique et l'acide chlorhydrique concentré qui lui conférait une coloration brune, comme d'ailleurs l'iodure de potassium. La chitine était colorée en rouge violet par l'iodure de potassium après traitement par l'acide sulfurique, en violet par le chloriodure de zinc et en rouge écarlate par le brome. Mais d'après WISSELINGH, GILSON, VOUK et BRUNS-WICK, le caractère essentiel de cette substance consistait en ce qu'elle fournissait, après hydrolyse à chaud par la potasse caustique, des cristaux en forme de macles ou haltères, donnant le phénomène de la croix noire en lumière polarisée; ces cristaux se coloraient en rouge par le rouge congo et par la fuchsine acide et en jaune par l'acide picrique. WETTSTEIN, ayant étendu cette étude microchimique à de nombreux thallophytes, proposa même une classification fondée sur la présence ou l'absence de chitine.

En raison des nombreuses discussions soulevées

par cette question, nous nous sommes proposé d'apporter notre contribution à sa solution; nos travaux sur le *Phytophthora cambivora* nous ont fait reconnaître que la membrane de ce champignon présentait, après un séjour de quelques mois dans certains milieux, en particulier dans une solution de saccharose à 3 %, des épaissements centripètes considérables, aussi bien en ce qui concernait le thalle, les conidies, les chlamydospores que les spores.

Nous avons étudié l'effet produit par les colorants sur les membranes ordinaires d'abord, sur les membranes épaissies ensuite.

Nous avons employé comme principaux colorants : l'iodure de potassium, le lugol, l'acide iodhydrique fumant, le rouge congo, la benzoazurine, la deltapurpurine, l'acide osmique, le brun vésuvien, le rouge de ruthénium, le bleu C4B et le soudan III, et, comme réactifs hydrolysants : l'acide sulfurique, l'acide azotique, le chlorure de zinc et le réactif de Schweitzer.

Les membranes non épaissies du mycélium, des conidies, des spores, des renflements, traitées directement par l'iode, par le lugol ou par l'acide osmique, prennent une teinte jaune très distincte; ces colorations sont assez persistantes, surtout quand on les compare à d'autres comme celles qui sont produites par le rouge congo, la deltapurpurine, la benzoazurine, le brun vésuvien, le rouge de ruthénium, dont l'action est très éphémère et disparaît en particulier au lavage. Le bleu de coton C4B colore les membranes en un bleu azur assez fugace. Le rouge de ruthénium a une action plus nette sur le protoplasme que sur les parois; celles-ci se colorent d'autant plus vite que la concentration de la solution est plus faible, tandis que le protoplasme conserve longtemps la

teinte rouge, quelle que soit la concentration du colorant. Nous sommes porté à conclure, d'après les réactions du rouge de ruthénium, que le protoplasme n'est pas seulement un complexe chimique de protéine, de substances callosiques et hydrocarbonées, mais encore de composés pectiques. Cependant, l'emploi du rouge de ruthénium ne nous a pas permis de déceler la présence de bouchons pectiques homogènes dans les filaments.

Les parois normales du mycélium ou des conidies résistent nettement à la solution cuproammoniacale, à la potasse caustique, à l'acide azotique, à l'acide sulfurique légèrement étendu et même à l'acide sulfurique concentré quand le mycélium est âgé. Lorsque les membranes ont été ainsi traitées au préalable et lavées rigoureusement, les colorants donnent les résultats suivants : avec le bleu C4B, une coloration bleue virant au vert-violet après traitement par l'acide sulfurique et une coloration d'un bleu vert uniforme après traitement par la potasse ; avec le rouge congo, quel que soit le traitement préalable, une coloration rouge ou bleue : d'un rouge franc, légèrement verdâtre sur les bords du mycélium, quand la préparation n'est pas acidulée, et bleue dans le cas contraire ; avec la benzoazurine, une coloration bleu pâle virant au vert sur les bords des filaments ; avec le soudan III, une coloration rose jaune ou jaune vert ; avec le lugol et le chloriodure de zinc, une coloration tantôt bleue, tantôt violette, s'intensifiant au bout de quelques heures et finissant par virer au brun ; avec le rouge de ruthénium, une coloration rose d'intensité et de persistance variables suivant les endroits.

Les choses se passent d'une façon différente dans un mycélium à parois épaisses. Les réactifs colorants donnent une teinte plus accentuée et plus durable,

surtout quand le mycélium n'est pas traité au préalable par des réactifs hydrolysants. La solution cuproammoniacale ne provoque au début aucune altération perceptible au microscope; c'est seulement au bout de 3 ou 4 heures que l'on remarque des fissures transversales s'accroissant avec la durée de l'action du réactif. Un tel mycélium, traité après lavage par l'iode, se colore en toute une gamme passant du bleu au violet et même au rouge; l'action du rouge congo sur ce mycélium est aussi très nette. Un phénomène analogue s'observe après traitement par des acides concentrés avec cette différence toutefois que l'attaque se traduit par une dissociation lamellaire des parois épaissies, particulièrement distincte sur la planche V, figure 1, où le renflement homogène peut être considéré à l'origine comme une conidie. Le chloroiodure de zinc et la potasse caustique ont à la longue le même effet dissociant sur les épaississements, mais le chloroiodure de zinc provoque en plus une coloration de la membrane allant du bleu au rouge en passant par le violet, ce qui tendrait à prouver l'existence de substances hydrocarbonées.

Des colorations analogues ont été obtenues par WISSELINGH, VOUK et BRUNSWICK, dans leurs recherches sur la chitine; c'est pour cette raison que nous avons été amené à poursuivre cette étude en traitant le matériel par de la potasse caustique à 33 % en autoclave à la température d'environ 135° pendant une demi-heure sur des lames à concavité. Après refroidissement, le matériel fut soigneusement lavé à l'eau distillée et ensuite traité en partie par l'acide sulfurique, en partie par l'acide azotique et en partie par l'acide chromique; après un nouveau lavage, nous l'avons coloré par le rouge congo. L'examen au microscope nous a permis de cons-

tater qu'entre les mailles du réseau constitué par un mycélium rouge vif se trouvaient de petits cristaux également rouges à aspect non homogène. En lumière polarisée, ces cristaux donnaient avec la plus grande netteté le phénomène de la croix noire.

Les résultats de cette expérience concordèrent avec ceux de VOUK et de BRUNSWICK, à cette différence près cependant que le traitement à l'acide sulfurique ne donna pas lieu à l'apparition des cristaux.

Devant l'ensemble des résultats, nous avons été amené à penser que nous nous trouvions en présence de cristaux de chitosane provenant de l'attaque de la chitine par la potasse caustique à chaud. D'autre part, le mycélium, après traitement à la potasse et lavage, fut soumis à l'action d'une solution iodo-iodurée qui détermina une coloration bleue violacée assez durable comme lorsqu'il était traité directement par cette solution; le rouge congo colora ce mycélium en rouge franc virant au bleu en milieu légèrement acidulé. Le bleu de coton C4B permettait d'obtenir une coloration bleue plus intense que sur un mycélium non traité au préalable.

En conséquence, nous sommes arrivé à la conclusion que les parois constituaient un complexe chimique de callose, de cellulose, de protéines, de chitine et parfois de composés pectiques. La présence de cellulose et de chitine se révèle particulièrement nette dans le mycélium épaissi.

Les épaississements se produisent dans des conditions non encore bien définies; nous savons seulement que certains milieux sont particulièrement propices à leur formation : la solution à 3 % de saccharose et la solution à 3 % de glucose. D'autres milieux nous ont permis de constater quelques épaississements, mais d'une façon tout accidentelle : la solution

au tanin, le milieu de Petri, l'eau de source, le milieu au quaker-oat (culture ancienne de 10 mois).

Ces épaisissements sont caractérisés par une striation parallèle à l'axe longitudinal, nettement visible au microscope sans aucune coloration; ils sont quelquefois tellement prononcés qu'ils peuvent obturer les ramifications comme dans la planche V, figure 2. Il arrive aussi que le renforcement des parois soit délimité par une cloison au delà de laquelle le mycélium conserve une épaisseur normale (Pl. V, Fig. 3). D'autres fois, sur un mycélium à membrane normale apparaît une sorte de bourgeonnement qui, seul, subit le phénomène de l'épaississement (Pl. V, Fig. 4). Nous avons l'exemple (Pl. V, Fig. 5) de bourgeoisements successifs dont les éléments ont tendance à s'isoler et à se détacher de l'organe qui leur a donné naissance : c'est un de ces corps individualisés que représente la planche V, figure 6. Sur la planche V, figure 7, nous voyons un corps sphérique de grande dimension, ayant subi des modifications semblables de sa paroi, mais présentant la particularité de germer en de nombreux filaments sur lesquels nous n'avons remarqué aucun épaisissement; nous pensons donc que la germination a été postérieure à la transformation de la membrane de ce corps.

Partout où nous avons constaté ces épaisissements, le protoplasme est très vacuolisé, quand il ne fait pas complètement défaut; les matières lipoïdiques sont au contraire très abondantes et peuvent même subsister à peu près seules (Pl. V, Fig. 8).

5° Œufs.

Comme les autres *Phytophthorées*, le *Phytophthora cambivora* forme des œufs, mais ils sont aussi

difficiles à trouver sur la plante infectée qu'à obtenir en culture pure.

PETRI et DUFRÉNOY ont observé des œufs dans l'axe hypocotylé des jeunes plantules de châtaignier. Le premier les a décrits exclusivement sous la forme paragyne, tandis que le second semble admettre que, sur l'hôte, la forme amphigyne peut exister. Pour notre part, malgré les très nombreuses coupes que nous avons effectuées, nous n'avons jamais pu obtenir d'œufs à proprement parler, mais seulement des corps arrondis, ayant l'aspect d'oogones. Si nous ne pouvons donc exprimer une opinion précise sur cette question, nous admettons cependant très bien que les œufs prennent naissance dans les cellules de l'hôte, qu'il s'agisse du châtaignier (Pl. VI, Fig. 1) ou bien du chêne (Pl. VI, Fig. 2).

En culture pure, c'est PETRI le premier qui, en 1925, obtint des œufs de *Phytophthora cambivora*. Cet auteur préconisait l'emploi d'une infusion de carottes gélosée et acidifiée avec de l'acide malique, mais ne pouvait indiquer un moyen sûr de produire des œufs d'une manière suivie. ASHBY, en 1929, a décrit des œufs formés par le même champignon sur bouillie de farine de maïs gélosée et stérilisée. Nous avons signalé la présence d'œufs dans certaines de nos cultures, mais en quantité insuffisante pour permettre une étude sérieuse. Ces milieux, tous solides à l'exception d'un seul, sont les suivants : la terre argileuse qui nous a permis d'obtenir des œufs en deux mois, le quaker-oat en quatre mois et aussi le chaume de graminées, la carotte, le milieu « A ».

Nous avons pu observer ainsi des œufs de formes diverses : les plus nombreux étaient à anthéridie amphigyne (Pl. VI, Fig. 3); certains ne possédaient pas d'anthéridie du tout et, par conséquent, la parthé-

nogénèse ne devait pas être rejetée à priori (Pl. VI, Fig. 4); un seul semblait porter une anthéridie parogyne adhérente à sa paroi (Pl. VI, Fig. 5). Ce dernier cas, s'il était vérifié, serait donc comparable à celui

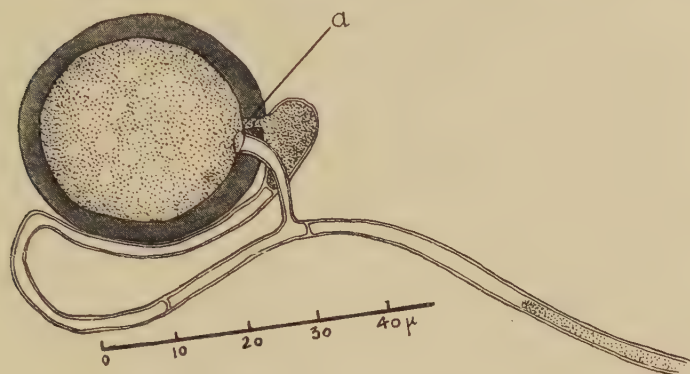


FIG. 13. — *Phytophthora Cactorum*. — Œuf de 6 jours observé en chambre de Van Tieghem; tube fécondateur pénétrant dans l'oogone en *a*.

du *Phytophthora Cactorum* que reproduit le dessin de la figure 13.

Non satisfait des premiers résultats, nous nous sommes proposé de faire apparaître des œufs en nombre plus important dans un délai plus court; à cet effet, nous avons commencé par répéter les expériences de PETRI sur bouillon de carottes, et avons pu, comme lui, observer dans quelques cas, au bout d'un temps compris entre 40 et 50 jours, la formation d'œufs à anthéridie amphigyne. Nous avons effectué nos essais sur des bouillons plus ou moins acidifiés; ceux qui nous ont donné les meilleurs résultats avaient un *pH* voisin de 4,4.

Les milieux gélosés que nous avons ensuite employés pour nos cultures étaient de compositions diverses :

1° Milieu synthétique de Petri gélosé dans lequel,

après un délai compris entre 15 et 30 jours, nous avons trouvé de nombreux œufs (Pl. XIV, Fig. 2).

2^o *Milieu de Petri gélosé modifié* (nitrate de calcium 0 gr. 25; sulfate de magnésium 0 gr. 15; phosphate monopotassique 0 gr. 30; chlorure de potassium 0 gr. 06, eau 1.000 gr.). Le champignon en culture sur ce milieu dont le $pH = 5,6$, a pu produire des oogones dès le troisième jour et des œufs au bout de 7 jours, mais la production constatée après 3 ou 4 semaines a été sensiblement inférieure à celle que nous avons obtenue pendant le même temps dans le milieu n^o 1 indiqué ci-dessus.

3^o *Série de liquides de Petri gélosés de différentes concentrations, depuis la dilution au 1/32 jusqu'à une concentration 25 fois plus élevée que dans le milieu de Petri* (40 gr. d'eau seulement au lieu de 1.000 gr.). Nous avons constaté la présence de nombreux œufs dans toutes ces cultures sauf dans les cultures voisines du maximum de concentration où nous n'en trouvons plus, comme l'indique le tableau ci-dessous :

Concentrations	C	C	C	C	C	Milieu de Petri				
	32	16	8	4	2	Concentration : C	C×5	C×7,5	C×10	C×25
pH	6,5	6,5	6,4	6	5,8	5,3	5	5	4,8	4,4
Quantité	Œufs très nombreux						Œufs assez nombreux		Œufs Néant rares	

4^o *Eau distillée et bi-distillée gélosée ou milieu gélosé seul* ($pH = 6,9$). Ce milieu nous a permis d'obtenir quelques œufs en une quinzaine de jours et des œufs nombreux au bout de 25 jours.

5^o *Mêmes milieux gélatinés au lieu d'être gélosés.* Ils n'ont donné aucun résultat.

Les ensemencements ont été effectués avec du mycélium prélevé sur carottes et ne datant que de 4 ou 5 jours; les résultats ont été beaucoup plus satisfaisants que dans le cas de l'emploi d'une culture plus âgée. C'est exclusivement dans le mycélium prélevé sur la carotte et repiqué sur milieu de Petri ou sur l'eau distillée gélosée qu'au bout de 3 semaines en moyenne ont pris naissance les œufs dont il n'y a pas trace dans les éléments nouveaux que ce mycélium ainsi repiqué a produits lui-même.

L'état hygrométrique extérieur semble avoir une certaine influence sur les résultats; il est donc bon de placer les tubes dans une atmosphère sèche sans les capuchonner de façon à permettre un libre passage de l'air. La température par contre joue un rôle prépondérant. Nous avons en effet obtenu des œufs d'une façon régulière pendant l'hiver dans un laboratoire où la température atteignait 22-24° pendant la journée et tombait aux environs de 15-12° pendant la nuit, alors que les mêmes expériences tentées pendant l'été, époque où cet écart de température est faible, ont été bien moins heureuses. Ces résultats sont en concordance avec ceux qu'a obtenus PETRI qui, à la suite des froids rigoureux de l'hiver 1924-25, a vu se former des œufs dans les cultures de *Phytophthora cambivora* isolées par lui des châtaigniers de Toscane.

Nous avons aussi employé une autre méthode qui a déjà été essayée (Blakeslee-Mucorinées); elle consiste à repiquer deux mycéliums de provenance différente dans un même tube; au bout de quelques jours, ceux-ci prolifèrent et vont à la rencontre l'un de l'autre. Aux points de jonction, l'on trouve quelquefois des œufs, mais ne sont-ils pas dus simplement au fait que le quaker-oat, milieu utilisé par nous, donne

des œufs au bout d'un temps suffisamment long? Nous avons voulu aller plus loin dans cette voie en employant des tubes spéciaux (Fig. 14), qui nous ont permis de faire l'expérience en repiquant des mycéliums différents sur des milieux différents. Les

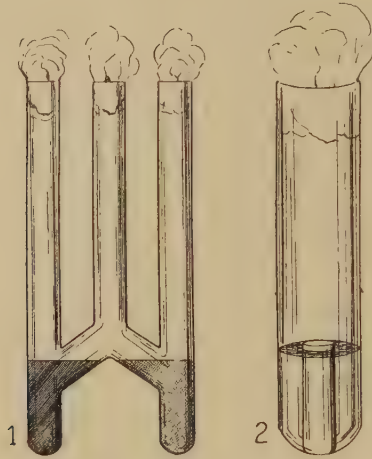


FIG. 14. — Dispositifs employés pour l'ensemencement de deux souches différentes sur deux milieux différents.

résultats n'ont pas été plus probants que dans le premier cas.

Si nous avons pu obtenir des œufs de *Phytophthora cambivora* sur milieu de Petri gélosé en abondance, ce qui nous a permis de les examiner du point de vue morphologique et d'en étudier les membranes, si nous avons pu réduire le délai d'apparition à 7 jours, nous n'avons cependant pas atteint les résultats que nous espérions; le cytoplasme de ces œufs, en général très altéré quand il ne fait pas complètement défaut, ne permet pas une étude cytologique. Nous aurions donc été dans l'obligation d'y renoncer, si, en nous livrant

à diverses expériences d'inoculation, nous n'avions eu la bonne fortune d'obtenir des œufs; voici dans quelles circonstances. Nous avons inoculé le *Phytophthora cambivora* à certaines plantes que nous avons fait germer aseptiquement après avoir soumis les graines à des bains divers, soit à l'hypochlorite de soude, soit à l'eau oxygénée, soit à l'acide sulfurique suivi d'une neutralisation à la chaux; dans ces différents cas, les graines ont été flambées à l'alcool pour diminuer encore les chances de contamination. Les plantes, dont nous nous sommes servi, sont les suivantes : pois de senteur, vesce, lupin, féverole, châtaignier, robinia pseudo-acacia, chêne; les deux dernières seules nous ont donné des résultats en ce qui concerne les œufs. Trois semaines après l'inoculation, alors que les feuilles de la plante hospitalière étaient flétries, nous avons prélevé une partie du mycélium resté à l'extérieur de la plantule; puis nous l'avons étudiée au microscope. Les filaments du mycélium, ayant probablement subi la réaction de la plante, donnèrent naissance dans certains cas à des œufs en très grande quantité, qui se sont révélés tout à fait intéressants du point de vue cytologique. Il semble donc qu'il soit nécessaire, pour pouvoir étudier les phénomènes nucléaires qui se passent dans l'oogone et l'œuf, de repiquer le *Phytophthora cambivora* sur une plante vivante et non dans un milieu sur lequel il vit en saprophyte.

Les œufs sont de deux sortes : 1^o les oosphères de dimensions réduites ne dépassent pas, en général, dix-huit microns, tandis que la longueur des anthéridies est 2 à 3 fois plus grande que le diamètre de ces oosphères (Pl. VI, Fig. 6); les parois sont souvent lisses dans ce cas; 2^o les oosphères de très grandes dimensions peuvent atteindre cinquante microns tandis que les

anthéridies sont très petites. Sur la photographie de la planche XIV, figure 3, on remarque que la paroi est ornée de protubérances nombreuses.

Une cloison transversale divise souvent les anthéridies en deux grandes cellules (Pl. XIV, Fig. 4). La paroi, jaune clair quand les œufs sont jeunes, peut devenir ocre foncé quand les œufs vieillissent, ainsi que nous l'avons observé dans une culture au quaker-oat datant d'un an.

La reproduction sexuée ne peut pas être plus nettement hétérogame que chez le *Phytophthora cambivora*. Le filament mycélien, dont l'extrémité se renflera plus tard en un oogone, traverse tout d'abord un mycélium qui à son tour produit un renflement pour former l'anthéridie. La photographie de la planche XIV, figure 5, est très instructive à ce sujet, car elle établit la continuité de la membrane du mycélium traversé et de celle de l'anthéridie. Sur la préparation, l'oogonophore rompu permettait, en faisant varier le point du microscope, de voir très distinctement un orifice circulaire au niveau du mycélium mâle, preuve certaine de la perforation. Nos résultats concordent donc avec ceux de MURPHY, qui, par ses travaux sur le *Phytophthora erythroseptica*, a démontré qu'au premier stade de la reproduction sexuée l'oogone pénétrait dans l'anthéridie. Nous avons nous-même vérifié le mode de formation de ces deux organes chez ce dernier champignon; à cet effet, nous avons employé comme milieu le bouillon de carotte gélosé en chambre de Van Tieghem. Nous avons ainsi constaté que les œufs commençaient à se former moins de 24 heures après l'inoculation et que quelques heures suffisaient à l'œuf pour prendre sa configuration définitive; ainsi l'oogone de la figure 15b n'est autre que l'oogone ébauché en a, mais observé

deux heures plus tard. En *c* est reproduite la forme la plus courante sous laquelle apparaît l'œuf de *Phytophthora erythroseptica*, et, en *d*, une forme plus rare il est vrai, mais qui, grâce à une cloison transversale, peut permettre de confondre l'œuf de ce champi-

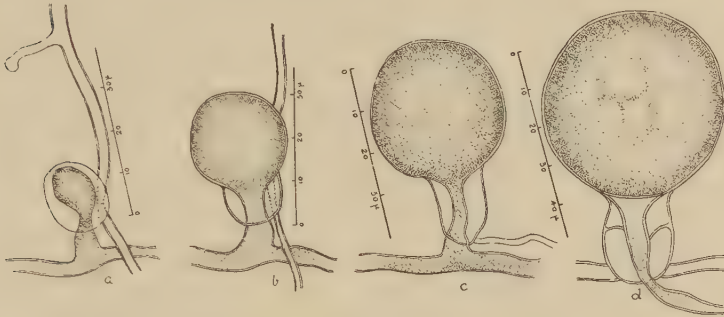


FIG. 15. — *Phytophthora erythroseptica*. — Évolution de l'œuf. (Pour la simplification des figures le protoplasme n'est représenté ni dans le filament mâle, ni dans l'anthéridie.)

gnon avec celui du *Phytophthora cambivora*; la similitude est en effet complète.

DUFRENOY émit l'opinion que, dans le *Phytophthora cambivora*, l'anthéridie se développait en spirale autour de l'oogone et l'encerclait entièrement avant d'en perforer la paroi pour assurer la fécondation. Nous ne sommes donc pas de l'avis de cet auteur qui comparait la formation de l'anthéridie du *Phytophthora cambivora* à celle du *Phytophthora omnivora*, parasite de l'*Eriobotrya japonica*.

Après avoir constaté la perforation d'un thalle par un autre thalle, nous nous sommes trouvé en présence de deux cas différents en ce qui concerne les positions respectives des organes mâle et femelle suivant le niveau auquel la coupe a été opérée : ou bien l'anthéridie entoure complètement l'oogo-

nophore, ce que montrent nos photographies, ou bien l'anthéridie ne l'entoure que partiellement comme semble l'indiquer le dessin de la planche VIII, figure 6.

Nous avons essayé de suivre *in vivo* le phénomène de la fécondation en employant, soit des chambres de Van Tieghem, soit des cellules de Ranvier. Nous avons, à cet effet, placé une goutte fondue de milieu de Petri gélosé, qui, en se refroidissant, nous a donné un milieu solide sur lequel nous avons repiqué une très faible quantité de mycélium; nous n'avons jamais



FIG. 16. — Renflements d'un mycélium après perforation d'un autre mycélium.

obtenu d'œufs, mais il nous a été permis de constater à plusieurs reprises qu'un mycélium en traversait un autre dans sa partie terminale avant de se renfler. Les dessins ci-contre reproduisent ce phénomène, que nous ne pouvons expliquer que comme un commencement de copulation n'ayant pas eu de suite (Fig. 16).

Chez certains *Phytophthora*, les œufs apparaissent au contact de deux mycéliums provenant d'une même spore; le cas se produit-il pour le *Phytophthora cam-bivora*? Il nous est difficile de nous prononcer, quoique, d'après la figure 17, il semble qu'une copulation puisse s'effectuer entre un thalle et un renflement ayant l'un et l'autre la même origine : c'est là un exemple d'adelphogamie ou d'association de thalles

frères. Il nous est impossible de considérer la proéminence sur le renflement (*a*) en direction de l'extrémité du thalle comme l'effet d'un hasard.

Il nous a été donné à plusieurs reprises d'observer des œufs séparés en deux par une cloison médiane,

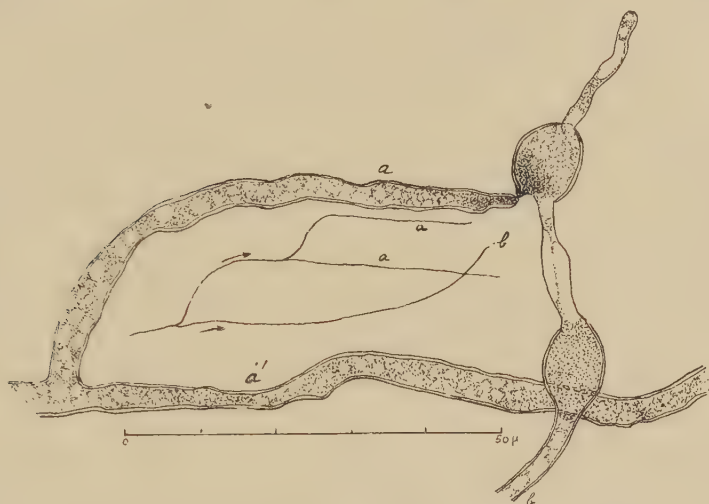


FIG. 17. — Deux thalles (*a* et *b*) en voie de copulation (exemple d'adelphogamie).

qui semble être la continuation de l'exospore comme le montre la planche VI, figure 7. Le bleu de coton employé comme colorant a une action beaucoup plus grande sur l'exospore que sur cette membrane médiane. Nous nous trouvons donc là en présence d'œufs jumeaux dont chacun doit avoir une individualité propre.

Les graisses très abondantes ont été facilement mises en évidence par le soudan III (Pl. VI, Fig. 4); nous en reparlerons dans notre étude cytologique. Les tubes fécondateurs sont souvent visibles; la planche VI, figure 8, nous montre qu'il y a communication entre l'anthéridie et l'oosphère.

Germination des œufs. — Nous n'avons pas observé

chez le *Phytophthora cambivora* la formation de spores dans l'œuf, ainsi que RICHON, FRECHOU, FARLOW et VIALA ont pu le constater chez le *Plasmopara viticola* et KIN chez le *Cystopus Tragopogonis*. Ils ont vu le protoplasme s'individualiser en petites masses qui, mises en liberté par rupture de la paroi, sont semblables aux spores nées dans les conidies et se comportent sans doute de la même façon. Nous avons cependant constaté souvent la germination directe (Pl. VI, Fig. 9); alors que l'œuf possède un cytoplasme réticulé et que ses noyaux sont gros, le mycélium ou les corps arrondis auxquels il a donné naissance contiennent un protoplasme dense et des noyaux plus petits. Cette germination est très distincte en de nombreux endroits sur le pourtour de l'œuf où la membrane a été perforée pour laisser libre passage au protoplasme.

La planche VI, figure 10, est la reproduction d'un œuf observé directement sans coupe; nous y voyons une oosphère bourrée de graisses qui germe en deux points différents, formant des vésicules dont l'une est vide et l'autre au contraire est pleine de protoplasme. Ce qu'il y a de plus intéressant sur cette figure, c'est la germination de l'oogonophore en un filament qui a traversé l'anthéridie. Dans le cas général, en effet, on ne voit que l'ébauche de cette germination parce que le filament jeune est rompu au niveau de la paroi anthéridienne (Pl. VI, Fig. 11). Nous avons pu mettre aussi en évidence (Pl. VI, Fig. 10) la prolongation de la coque de l'oosphère à l'intérieur de l'anthéridie, le long du filament porteur de l'organe femelle.

CHAPITRE V

ÉTUDE CYTOLOGIQUE

1^o Cytologie du mycélium, des sporanges et des spores.

A. *Chondriome*. — La constitution cytologique du *Phytophthora cambivora* a été étudiée par DUFRÉNOY, qui en a décrit la structure vacuolaire et mitochondriale aussi bien en milieux de culture que dans le tissu parasité par le champignon.

Nous avons employé, pour l'examen vital du chondriome, le vert Janus et le violet de dahlia, qui ont été reconnus par GUILLIERMOND capables de le colorer dans les phases qui précèdent la mort des cellules. La coloration subléthale à l'aide du violet de dahlia nous a permis à différentes reprises d'observer des mitochondries en forme de longs bâtonnets onduleux, disposés généralement dans le sens des courants cytoplasmiques, auxquels MEVES a donné le nom de «chondriocontes», et aussi en forme de petites sphérules reliées entre elles par de fins filaments (Pl. VII, Fig. 1). Il s'agit certainement dans ce dernier cas d'une altération provoquée par la toxicité du produit utilisé.

Pour pouvoir mieux observer la coloration vitale du chondriome, nous avons versé, dans un tube contenant de la carotte, une solution de violet de dahlia, plusieurs fois renouvelée, puis nous avonsensemencé ce milieu; le mycélium, en se développant,

est arrivé rapidement au contact du liquide; nous avons alors prélevé une partie de ce mycélium et constaté qu'elle avait subi l'influence de la coloration. Ce procédé nous a donné des indications précises en ce qui concerne le chondriome.

Nous avons pu observer quelquefois des mitochondries en nous servant de réactifs iodo-iodurés, qui les colorent en jaune. En traitant le mycélium par une solution à 2 % d'acide osmique pendant plusieurs jours à une température de 40°, nous avons obtenu des mitochondries colorées en noir, très nettes, généralement vésiculisées.

C'est en coupe que le résultat a été le meilleur. Les fixateurs qui paraissent le mieux convenir, c'est-à-dire ceux qui fixent les mitochondries dans la forme qu'elles présentent sur le vivant, sont les mélanges peu acides, en particulier ceux qui contiennent du formol, comme le Regaud ou le Helly. Une postchromisation dans le bichromate de potassium est nécessaire pour insolubiliser les lipoïdes qui entrent dans la composition des chondriosomes. L'emploi du mélange chromo-osmié de Meves suivi également d'une postchromisation par le bichromate de potassium nous a permis d'obtenir des mitochondries très nettes, principalement dans les œufs dont l'étude cytologique sera faite plus loin; la fuchsine acide et surtout l'hématoxyline ferrique colorent électivement, d'une manière parfaite, le chondriome. La triple coloration à la safranine, au violet de gentiane et à l'orange G subséquente à la fixation au Flemming faible nous a donné de belles mitochondries colorées en bleu.

La planche VII, figure 2, nous montre la structure mitochondriale dans la partie postérieure d'un filament; les chondriosomes sont le plus souvent disposés dans le sens longitudinal du mycélium. Sur la

planche VII, figure 3, nous distinguons dans un filament renflé une structure granuleuse et des mitochondries en forme d'haltères, probablement en voie de division par sectionnement transversal, tandis que la planche VII, figure 4, laisse apparaître une structure nettement vésiculisée.

La disposition des chondriosomes dans les sporanges (Pl. VII, Fig. 5) et dans les spores (Pl. VII, Fig. 6) semble n'obéir à aucune loi; les mitochondries sont de formes très variables : courtes ou allongées, onduleuses ou rectilignes, quelquefois vésiculisées.

Sur la planche VII, figure 7 (*a-b-c-d*), nous voyons divers états d'altérations cytologiques sur des renflements du mycélium en culture au cours du vieillissement; les noyaux sont très peu nombreux ou ont complètement disparu, le protoplasme s'est contracté à l'intérieur de la paroi, les mitochondries désagrégées apparaissent sous forme de petits grains disposés en files ou de grains plus gros dispersés çà et là sur le réticulum du protoplasme. A un stade plus avancé, les mitochondries sont toutes vésiculisées.

B. Noyaux. — Les fixateurs qui nous ont rendu le plus de services sont le Bouin ou picroformol acétique et le Flemming fort; le meilleur colorant est sans contredit l'hématoxyline ferrique, mais l'hémalun, l'hématoxyline Delafield, le bleu de crésyl, le bleu de méthylène et même le bleu polychrome qui n'est cependant pas un colorant spécifique du noyau, nous ont permis d'obtenir de bons résultats. Nous avons aussi employé avec succès la triple coloration après Flemming faible ainsi que la réaction nucléale de Schiff-Feulgen.

Les noyaux se présentent sous deux formes différentes : dans un mycélium très jeune, ils sont allongés dans le sens du filament (Pl. VII, Fig. 8); dans un

mycélium plus âgé, les noyaux « au repos » sont de forme sphérique et laissent apparaître un seul nucléole également sphérique (Pl. VII, Fig. 9). La chromatine peut être ou bien homogène ou bien granuleuse. La dimension des noyaux quiescents est de 3 μ . environ.

Nous avons longuement cherché le processus de la division des noyaux; il ne nous a jamais été donné d'observer un exemple caractéristique de caryocinèse, quel que soit l'âge du mycélium ou du sporange, quel que soit le fixateur employé, quelle que soit l'heure où la fixation a été opérée. Pensant en effet que, pour le *Phytophthora cambivora*, la « mitose vraie » pouvait s'effectuer au cours de la nuit, comme c'est le cas pour de nombreux phanérogames, nous avons fixé au Meves et au Helly, pendant cinq nuits consécutives, à des heures diverses, des mycéliumsensemencés tous le même jour sur des milieux identiques. Nous avons été obligé de conclure par la négative, mais nous avons été conduit à certaines constatations intéressantes : dans le mycélium très jeune, de 2 jours au plus, le noyau s'allonge et s'étrangle en son milieu, puis une rupture se produit au niveau de la partie effilée, donnant ainsi naissance à deux noyaux fils (Pl. VII, Fig. 10). L'amitose paraît donc être le mode de division normal, mais faut-il la considérer comme le mode exclusif? La planche VII, figure 11, nous montre différents noyaux, dont l'un, granuleux, représente peut-être le stade spirème, alors que, sur la même figure, les deux noyaux accolés ne sont peut-être que des noyaux néoformés au stade de la télophase; ce n'est d'ailleurs là qu'une hypothèse, puisque nous n'avons pas pu saisir les stades intermédiaires.

Dans le sporange, la division amitotique a été observée par nous et reproduite sur la planche VII,

figure 12. Des divisions successives peuvent donner naissance à de nombreux noyaux répartis dans le protoplasme sans qu'il y ait différenciation en zoospores (Pl. VII, Fig. 13). Le cloisonnement d'un sporange jeune est très net sur la planche VII, figure 14, où nous distinguons quatre cellules, pourvues chacune de leur noyau. A un stade plus avancé (Pl. VII, Fig. 15), nous voyons un gros noyau dans chacune des spores nettement différenciées. Ces noyaux sont de dimensions supérieures à celles des noyaux quiescents du mycélium.

La distinction entre les conidies et les sporanges peut donc être fondée sur ce que, dans les premières, les noyaux se divisent sans que le protoplasme se segmente, tandis que, dans les seconds, la division est suivie d'une fragmentation de ce protoplasme en zoospores.

C. *Vacuoles, Graisses.* — Les vacuoles absorbent électivement le rouge neutre, le bleu de crésyl et le bleu de méthylène lorsque les filaments sont immergés dans des solutions de ces colorants. Il n'en est pas de même quand le mycélium est repiqué sur des milieux gélosés colorés; les filaments croissent normalement, mais restent incolores.

Dans les filaments jeunes, les vacuoles sont généralement filamenteuses, tandis qu'elles sont de forme arrondie et volumineuses dans un mycélium âgé. A l'extrémité du thalle, les vacuoles apparaissent, soit sous forme de gouttes assez grosses (Pl. VII, Fig. 16), soit, plus rarement, sous forme de fines gouttelettes. La structure filamenteuse s'observe davantage dans une partie du thalle plus éloignée de la partie apicale (Pl. VII, Fig. 17). Ces vacuoles filamenteuses, qui sont dirigées dans le sens des courants cytoplasmiques parallèlement aux mitochondries peuvent s'anastomoser pour donner une grande vacuole

unique; nous avons eu souvent l'occasion de constater ainsi la coalescence des petites vacuoles (Pl. VII, Fig. 18). Inversement, nous avons pu observer à plusieurs reprises la division des vacuoles préexistantes. Quand le mycélium est âgé, les grosses vacuoles ont tendance à occuper, par places, à peu près toute la cavité de l'hyphe, repoussant le cytoplasme et les noyaux contre les parois.

La présence de grandes vacuoles est fréquente dans les zoospores (Pl. III, Fig. 11) et dans les conidies au moment de la germination (Pl. VII, Fig. 19).

Les vacuoles renferment en solution des cristalloïdes susceptibles de produire de gros cristaux; c'est le cas que nous avons observé fréquemment dans le suc vacuolaire du *Phytophthora cambivora*, ensemencé sur milieu de Petri gélosé.

Le protoplasme contient généralement de fins globules de graisses plus ou moins nombreux suivant la nature du milieu utilisé, colorables par le rouge soudan et par le bleu d'indophénol naissant (Pl. VII, Fig. 20). De nos observations, il résulte que, plus le milieu est riche en substances hydrocarbonées, plus est abondante la présence des graisses; DUFRÉNOY assure que les solutions neutres ou alcalines favorisent le développement de celles-ci.

Quand le protoplasme vieillit, il s'enrichit en globules lipoïdiques, qui correspondent à la dégénérescence grasseuse de la cellule animale. Dans un mycélium mort, c'est-à-dire où il n'y a plus ni noyaux, ni protoplasme, on constate la présence de grandes plages de graisse, telles que le représente la planche IV, figure 14.

Le vacuome apparaît souvent sous forme de gouttes entremêlées d'éléments graisseux; c'est ce que nous avons pu mettre en évidence à l'aide d'une double

coloration dans le mycélium élargi de la planche VII, figure 21.

Lorsque les graisses ne se présentent pas en une masse compacte, mais en fragments plus ou moins grands, nous avons pu constater que les gouttes grasses étaient quelquefois entourées d'une auréole de liquide vacuolaire (Pl. VII, Fig. 22). Le rouge neutre colore cette auréole en rouge vif; le bleu de crésyl, qui donne généralement à la vacuole une teinte bleue violacée, la colore en bleu azur, ce qui tendrait à prouver une plus grande acidité provoquée par la présence des graisses ou acide gras; il est cependant possible que ce virage au bleu azur soit dû à la vieillesse même du thalle, car, à l'état de délabrement complet de la structure cytologique, tout son contenu se colore en bleu ou bleu vert, tandis que, dans un thalle jeune, le système vacuolaire se colore en bleu violacé. Ce phénomène, assez fréquent, s'observe surtout dans le champignon cultivé dans l'eau de source.

DUFRENOY a pu déceler, à l'aide du bleu de crésyl, après fixation au formol, quelques corpuscules métachromatiques dans le vacuome du *Phytophthora cam-bivora*, surtout dans les jeunes sporanges. Il a obtenu directement par le rouge neutre des précipités vacuolaires rouges flottant dans le liquide vacuolaire rose, et a constaté que, dans certains cas, tout le contenu vacuolaire était précipité le long des parois de la vacuole sous forme de « dyciosomes ».

Pour essayer de mettre en évidence la présence des corpuscules métachromatiques, nous nous sommes servi de mycéliums très jeunes que nous avons fixés au picroformol pendant une heure. Après lavage à l'alcool à 70° et coloration pendant des temps variables, soit par l'hémalun, soit par l'hématoxyline

Delafield, soit par le bleu de crésyl, bien que les expériences aient été maintes fois répétées, les résultats ont toujours été négatifs.

L'emploi du bleu polychrome ou de Unna avec régression, soit au glycerinäthermischung, soit au tanin orange, ne nous a pas davantage permis de confirmer les observations de DUFRÉNOY.

En ce qui concerne les corpuscules métachromatiques, il y a identité de résultats entre ceux que GUILLIERMOND a obtenus avec les Saprologniées et ceux que nous avons nous-même obtenus avec le *Phytophthora cambivora*, ce qui n'a rien d'étonnant en raison de la parenté qui existe entre ces deux espèces de champignons.

Malgré tout, pour essayer de conclure, nous avons voulu chercher, chez d'autres *Phytophthorées*, s'il existait ou non des corpuscules métachromatiques; nous n'en avons jamais trouvé, bien que nos expériences aient été faites, tantôt sur le mycélium, tantôt sur les sporanges, tantôt sur les corps intercalaires, tantôt sur les œufs, et bien qu'elles aient porté sur de nombreuses variétés différentes : *P. citrophthora*, *P. parasitica*, *P. Cactorum*, *P. erythroseptica*, *P. terrestris*, *P. Cinnamomi*.

2° Cytologie de l'œuf.

Nous avons éprouvé les plus grandes difficultés à obtenir des œufs en quantité suffisante pour pouvoir décrire la reproduction sexuée chez le *Phytophthora cambivora*. Certes, la méthode que nous avons décrite plus haut et qui consiste à prélever sur carotte du mycélium et à le repiquer sur milieu de Petri gélosé, nous a donné des résultats, mais

les œufs ainsi obtenus ne nous ont pas permis, en général, du point de vue cytologique, d'élucider le problème : ces œufs de culture sont le plus souvent vides. Néanmoins, en inoculant le champignon sur certaines plantes, sur le robinia pseudo-acacia et sur de jeunes plantules de chêne en particulier, la partie du mycélium restée à l'extérieur de la plante, mais subissant probablement la réaction de celle-ci, a, dans certains cas, rares il est vrai, donné lieu à la production d'œufs, qui se sont révélés particulièrement intéressants. Faute de matériel, il ne nous a pas été possible de suivre pas à pas tous les stades, notamment ceux des mitoses, bien que nous ayons pu saisir quelques divisions de noyaux. Les travaux antérieurs sur les œufs des Péronosporées, ceux de P. A. DANGEARD, de WAGER, de BERLESE, de STEVENS, de DAVIS, de MURPHY et de KIN ont été pour nous des guides précieux dans l'étude qui va suivre.

A. *Oogone et Anthéridie. Formation de l'Oosphère et du tube fécondateur.* — L'oogone est de forme sphérique et contient dans un cytoplasme vacuolisé des noyaux dont le nombre variable (Pl. VIII, Fig. 1-2) peut atteindre le chiffre de 150 environ; ces noyaux, dans le cas de la figure 2, sont pourvus d'une membrane, d'un nucléole et de chromatine diffuse. L'anthéridie amphigyne, généralement séparée en deux par une cloison transversale, possède en quantité bien moindre des noyaux, dont nous n'avons jamais pu constater la division (Pl. VIII, Fig. 3-4-5). Sur la planche VIII, figure 6, cependant, nous voyons, dans une anthéridie coupée transversalement, deux noyaux tout près l'un de l'autre, semblant provenir d'une division récente.

Les vacuoles sont réparties à peu près également dans tout l'oogone (Pl. VIII, Fig. 7-8) jusqu'à ce que

le cytoplasme subisse une sorte de déplacement centripète, laissant derrière lui des trabécules qui le relient à la membrane; ce cytoplasme se condense pour former le périplasme dans la région périphérique, d'une part, et pour donner naissance, d'autre part, dans la région centrale, à une masse dense (Pl. VIII, Fig. 9) qui n'est autre que l'ooplasme. Les vacuoles qui ont pris alors une plus grande extension ont tendance à se localiser entre le périplasme et l'ooplasme. Les noyaux qui se trouvaient auparavant en n'importe quel endroit du cytoplasme (Pl. VIII, Fig. 8) ont émigré à la périphérie (Pl. VIII, Fig. 9-10-11), où ils subissent, nous semble-t-il, une mitose comme le montre la planche VIII, figure 12-13. Nous n'assistons pas, il est vrai, à la division proprement dite, mais nous voyons deux noyaux situés souvent côte à côte, stade immédiatement postérieur à la télophase. Au même moment s'est formée, aux dépens de l'ooplasme, une accumulation protoplasmique centrale à laquelle Stevens a donné le nom de « cœnocentre » et qui se présente sous deux aspects différents : soit d'une masse compacte et homogène (Pl. VIII, Fig. 14), soit d'une étoile à plusieurs pointes dont les extrémités se confondent avec le réticulum du cytoplasme (Pl. VIII, Fig. 10 et 15).

L'ooplasme devient régulièrement réticulé par suite du développement des vacuoles et l'on trouve des mitochondries sphériques ou effilées disposées le long des trabécules (Pl. VIII, Fig. 14-15), alors que, dans les stades antérieurs, le protoplasme était plus dense et que les mitochondries du jeune oogone se présentaient sous forme de longs bâtonnets épais et flexueux (Pl. VIII, Fig. 1).

Après l'apparition du cœnocentre, les noyaux fils quittent la périphérie pour rentrer dans l'oosphère,

où ils subissent une deuxième division (Pl. IX, Fig. 1), pendant laquelle la membrane nucléaire semble persister; dans la masse homogène du nucléoplasme, on peut distinguer de petits granules de chromatine qui serviront probablement à la formation des chromosomes; les centrosomes sont à peine visibles. Tous les noyaux fils sortent à nouveau de l'ooplasmе, sauf un qui reste accroché par une extrémité au cœnocentre où il puise peut-être sa nourriture pour augmenter de volume (Pl. IX, Fig. 2).

Dans l'anthéridie, les noyaux occupent à ce stade une position périphérique (Pl. IX, Fig. 3), puis le cytoplasme se contracte, comme le prouvent les trabécules encore en liaison avec la paroi (Pl. IX, Fig. 4-5), et un tube fécondateur apparaît rempli d'un liquide très homogène et muni d'une fine membrane. A l'extrémité de ce tube en forme de doigt de gant (Pl. IX, Fig. 6) ou de sac (Pl. IX, Fig. 7), se trouvent exceptionnellement deux noyaux (Pl. IX, Fig. 5), mais généralement un seul, ce qui, d'ailleurs, est logique, puisque, nous le verrons plus loin, un seul noyau femelle a besoin d'être fécondé.

B. Fécondation. — Le tube fécondateur, qui, en général, prend une assez grande extension, pénètre alors dans l'oosphère, et son extrémité, s'étant dissoute, sous l'influence d'une enzyme probablement, libère à l'intérieur de cette oosphère une partie de son contenu, dont le noyau mâle qui doit servir à la fécondation; puis le tube se contracte et perd de sa netteté, mais on peut quand même suivre sa trace dans le cytoplasme aux stades ultérieurs (Pl. IX, Fig. 8). Nous avons pu, en coupant le même œuf à des niveaux différents, observer d'une part le noyau femelle au contact du cœnocentre (Pl. IX, Fig. 2) et d'autre part le tube fécondateur à l'extrémité duquel est

nettement visible le noyau mâle qui va participer à la fécondation (Pl. IX, Fig. 7). Le cytoplasme perd alors son aspect vacuolaire et devient dense; les autres noyaux en dehors des noyaux mâle et femelle vont dégénérer et les mitochondries reprennent l'aspect qu'elles avaient dans l'oogone jeune : elles deviennent longues, épaisses et ondulées.

C. *Maturation de l'oosphère.* — Le cœnocentre disparaît et il ne reste plus en présence que deux noyaux devenus très gros à partir de ce moment, le noyau mâle et le noyau femelle. Ces noyaux, au contour bien défini, sont de forme arrondie; ils sont homogènes (Pl. IX, Fig. 8) ou présentent au contraire des granulations très nettes (Pl. IX, Fig. 9). Le noyau mâle va se rapprocher du noyau femelle et tous deux fusionnent finalement (Pl. IX, Fig. 10), comme c'est le cas chez le *Cystopus candidus*, chez le *Cystopus Tragopogonis*, chez le *Peronospora effusa* et chez le *Phytophthora erythroseptica*, de façon à donner naissance à un seul gros noyau, qui apparaît homogène sur la planche IX, figure 11. Le noyau unique semble se diviser comme le montre la prophase visible sur la planche IX, figure 12, mais nous n'oserions pas être très affirmatif sur ce point. Très souvent, l'œuf entre rapidement en dégénérescence, prenant l'aspect reproduit sur la planche IX, figure 13.

D. *Chondriome et Vacuome.* — Nous avons vu que le cytoplasme vacuolisé dans l'oogone fait place à un cytoplasme réticulé, c'est-à-dire dans lequel les vacuoles ont pris une grande extension, tant par leur nombre que par leur dimension; ce phénomène se produit dès la formation du cœnocentre et subsiste jusqu'à sa disparition, c'est-à-dire après la fécondation de l'oosphère; puis la structure finement réticulée disparaît et le cytoplasme redevient pendant la maturation

de l'oosphère ce qu'il était dans l'oogone jeune, mais il est plus dense qu'à ce stade.

Les vacuoles réparties çà et là dans l'oogone jeune subissent un exode vers la périphérie qui est très apparent au moment de la formation de l'ooplasme et du périplasme et qui subsiste souvent jusqu'à ce que seuls les noyaux mâle et femelle soient en présence dans l'oosphère. A ce moment-là, les vacuoles disparaissent à peu près complètement ou sont tout au moins très petites.

Les mitochondries sont abondantes dans le jeune oogone et aussi dans l'anthéridie. Au stade de différenciation de l'oosphère, on les trouve, soit sous forme de granules sphériques, soit en bâtonnets très fins, dans le périplasme et dans l'ooplasme le long des trabécules. Dans l'œuf formé, on trouve aussi des mitochondries nombreuses, mais plus longues et plus épaisses.

Les graisses apparaissent dans les œufs en grande abondance. C'est la partie centrale de l'ooplasme qui en est le siège principal; le périplasme et l'anthéridie en contiennent bien moins. Ces graisses se trouvent dans l'ooplasme sous forme d'un gros globule unique, ou au contraire de gouttes, plus ou moins grandes, mêlées au protoplasme. Ce dernier fait souvent complètement défaut : les graisses alors occupent exclusivement l'intérieur de l'œuf.

La plus grande partie des œufs qui se sont formés en culture sur milieu synthétique sont particulièrement riches en graisses; celles-ci jouent certainement moins dans ce cas le rôle d'une réserve alimentaire qu'elles ne sont le signe d'une dégénérescence, puisque ces œufs, le plus souvent vides, se montrent à l'examen dépourvus de tout intérêt du point de vue des divisions nucléaires.

E. *Exospore et endospore*. — La constitution chimique des diverses membranes des œufs de *Péronosporées* a été étudiée par de BARY, MAGNUS, PRILLIEUX et MANGIN.

Dans son étude approfondie sur le *Peronospora affinis* et le *Peronospora Viciæ*, en ce qui concerne tant les œufs que le mycélium, MANGIN arriva à la conclusion que l'endospore était constituée de cellulose et de callose, l'exospore ou épispore de callose seulement; il ne trouva pas trace de composés pectiques.

Ces résultats se rapprochaient bien plus de ceux de DE BARY, qui constatait l'existence de cellulose et de callose, que de ceux de MAGNUS, qui ne reconnut dans l'exospore que la présence de cellulose et de protéines.

D'après MANGIN, la callose ne se présentait dans l'endospore que sous forme de reliquat provenant probablement de son contact avec l'exospore.

Dans un travail récent sur le *Cystopus candidus*, KIN concluait à la nature mixte callosique et cellulosique de l'endospore et de l'exospore avec prédominance cependant de cellulose dans la coque jeune; d'après son opinion la coque âgée devait se charger de composés pectiques colorables en rose par le rouge de ruthénium.

Les œufs de *Phytophthora cambivora* ne donnent pas toujours la possibilité de discriminer les deux membranes; quelquefois, en effet, ils sont recouverts d'une seule enveloppe, épaissie à un degré variable. Le mode de formation de l'exospore et de l'endospore est très simple; l'endospore se forme certainement plus tard que l'exospore, probablement aux dépens du périplasme (Pl. VIII, Fig. 9), mais, alors que l'endospore est d'épaisseur et de courbure à peu près

constantes, l'exospore est souvent tout à fait irrégulière, présentant, comme nous l'avons déjà vu, des protubérances de grandes dimensions. Celles-ci sont représentées sur un fragment de calotte d'exospore (Pl. X, Fig. 1), colorées en noir par l'hématoxyline sur un fond rose dû à l'érythrosine; la planche X, figure 2, qui reproduit la coupe transversale d'une calotte, nous permet de distinguer qu'au moins deux matières différentes entrent dans la composition de l'exospore; l'une, noyée dans l'autre, émerge en certains endroits, donnant à la calotte vue de face un aspect ponctiforme.

Notre étude fut effectuée sur des œufs provenant de cultures synthétiques et sur des œufs obtenus sur plantules inoculées expérimentalement, comme nous l'avons indiqué en tête de ce chapitre. Suivant la méthode de Mangin, les œufs ont été traités au préalable à l'hypochlorite de soude, lavés à l'eau distillée et soumis à l'action de la potasse caustique.

Ainsi préparée, l'endospore prend avec le chloriodure de zinc, l'acide iodhydrique, ou même une solution iodo-iodurée, une teinte bleu azur; l'exospore et les ornements se colorent également, mais en un bleu bien plus clair (Pl. X, Fig. 3). Le soudan III, utilisé comme second colorant, permet de constater une mince couche jaune extérieure, tandis que le centre prend une teinte brune d'intensité variable, probablement en rapport avec les inégalités d'épaisseur du revêtement intérieur.

Ces réactions nous démontrent, d'une part, que l'endospore est plus riche en cellulose que l'exospore, y compris les échinules, d'autre part, que la mince pellicule qui entoure l'œuf ainsi que le revêtement intérieur de la coque sont l'une et l'autre de nature lipodique.

Si la partie externe de l'exospore et la partie interne de l'endospore semblent de composition définie, il n'en est pas de même de la zone intermédiaire qui se colore par le bleu C4B; celle-ci est donc, non seulement de nature cellulosique, mais aussi de nature callosique, surtout en ce qui concerne l'exospore (Pl. X, Fig. 4-5). La proportion de callose entrant dans la composition des échinules ne semble pas constante si l'on compare la faible coloration obtenue par le bleu coton dans le cas de la planche X, figure 5, avec la teinte bleue due à ce même colorant sur une exospore d'une part (Pl. X, Fig. 6) et sur une endospore d'autre part (Pl. X, Fig. 7). La calotte sphérique de l'endospore soumise à l'action du soudan III, prend une coloration uniforme brun rouge; ceci permet de penser qu'une transformation lipoïdique superficielle est intervenue à la suite de la désagrégation de l'exospore qui, en raison de son altération, n'a pas été reproduite sur le dessin.

Les composés pectiques se trouvent, comme le montre la planche X, figure 8, abondants dans l'exospore qui se colore plus intensément que le reste de l'enveloppe.

En résumé, la callose et la cellulose se trouvent dans les deux membranes, mais il y a une prédominance de cellulose dans l'endospore et de callose dans l'exospore et les échinules. Dans l'enveloppe se trouvent aussi des composés pectiques. Enfin l'œuf est entouré extérieurement d'une mince couche qui se colore en jaune sous l'influence du soudan III; la face interne de l'endospore est également de nature lipoïdique. Ces résultats se rapprochent sensiblement de ceux obtenus par KIN pour le *Cystopus candidus*, bien que cet auteur n'ait pas employé les mêmes réactifs que nous.

CHAPITRE VI

ACTION PATHOGÈNE DU PHYTOPHTHORA CAMBIVORA SUR LE VÉGÉTAL

Comme nous l'avons signalé dans la première partie de notre étude, le *Phytophthora cambivora* se cultive sur les milieux les plus variés, synthétiques ou naturels, morts ou vivants : se nourrissant indistinctement des substances les plus diverses, soit en saprophyte, soit en parasite, sa polyphagie est manifeste.

Les modifications de son aspect extérieur et le manque de fixité des organes de multiplication s'expliquent difficilement par l'emploi de tel ou tel milieu et cependant l'influence du milieu est indéniable quant au temps de production et d'accroissement des diverses formes du champignon. D'ailleurs, à ces différents points de vue, le *Phytophthora cambivora* ne semble pas constituer une exception parmi les Phytophthorées.

D'une façon générale, la détermination des micro-organismes est souvent fondée sur le rôle qu'ils jouent dans l'attaque d'une plante déterminée; en ce qui concerne le *Phytophthora cambivora*, nous sommes loin de penser que son pouvoir pathogène soit aussi nettement spécifique. Ce champignon peut en effet être inoculé, comme il résulte de nos essais, aussi bien aux graminées, aux légumineuses, aux conifères, qu'aux cupulifères, famille à laquelle appar-

tient le châtaignier, principale victime du parasite. Désirant comparer les effets pathologiques du *Phytophthora cambivora* sur des végétaux différents, nous avons choisi d'une part le *Lupinus albus* comme plante herbacée et d'autre part le *Castanea vesca* comme plante ligneuse; nous nous sommes limité à ce choix pour simplifier l'exposé de nos résultats.

Les graines de lupin et les châtaigniers ont été, avant germination, traités par des désinfectants divers; la méthode de désinfection la plus efficace a consisté à immerger des graines dans l'acide sulfurique pur, à les laver dans l'eau stérile et enfin à les flamber à l'alcool au moment de la mise en tube. Si un traitement aussi radical a été suffisant pour préserver de toute contamination les graines de lupin, il n'en a pas été de même dans le cas des châtaigniers, car, sous le tégument, se dissimulent souvent des microorganismes très difficiles à détruire; le pourcentage de réussite dans la germination aseptique des châtaigniers est donc minime.

Dès que les plantules atteignaient un développement suffisant, nous procédions à leur inoculation; entre le cinquième et le huitième jour, nous découpons dans la région atteinte, caractérisée par un brunissement plus ou moins étendu, de petits morceaux de tissu que nous fixions ensuite dans différents liquides, tels que ceux de Bouin, Regaud, Meves, Nemec, Flemming à forte concentration en acide osmique.

1° Observations macroscopiques sur l'évolution de la maladie.

En ce qui concerne l'étiologie de la maladie provoquée par le *Phytophthora cambivora* chez le châtai-

gnier, les études de PETRI et de DUFRÉNOY sont de première importance; ce dernier auteur, en particulier, a pu observer les rapports cytologiques du parasite avec son hôte.

En raison de la nature polyphagique du champignon, nous nous sommes proposé de reprendre l'étude de ces savants en l'étendant quelque peu, afin de comparer les altérations que cause le parasite aux tissus du châtaigniers d'une part et à ceux d'un végétal différent tel que le lupin d'autre part.

L'attaque du châtaignier peut se porter aussi bien sur les racines que sur la tigelle ou les cotylédons. Une plantule infectée ne succombe pas brusquement; son dépérissement se traduit d'abord par une irrégularité du diamètre de la région envahie par rapport au diamètre de la région saine du voisinage. Ce premier symptôme du mal est suivi d'un brunissement de la région atteinte ainsi que des pointes végétatives, des bourgeons foliaires et des plus jeunes feuilles elles-mêmes. L'irrégularité constatée dans la manifestation de la maladie dépend très vraisemblablement de ce que les différents faisceaux vasculaires ne sont pas atteints simultanément.

Les racines commencent par brunir, puis elles noircissent et s'excorient; quel que soit l'endroit où est pratiquée l'inoculation, la plante continue sa croissance en même temps que le parasite s'y développe.

La planche XVI, figure 1, représente un jeune plant de châtaignier inoculé au niveau de l'axe hypocotylé. Quelques jours après l'inoculation, nous avons constaté la formation de fissures d'où ne tardèrent pas à s'échapper, sous forme de suintement, des gouttelettes noires. L'écoulement s'accrut avec le temps et la plante finit par se dessécher. Cet écoulement est identique à celui qui se produit sur les sujets

adultes atteints par le *Phytophthora cambivora* : il justifie le nom vulgaire de « maladie de l'encre ». La planche XVI, figure 2, montre un tronc d'arbre centenaire portant à sa base une large blessure d'où s'écoule le même liquide noir, qui n'est autre qu'un composé à base de tanin. La progression du mal sur un sujet adulte amène la chute totale du feuillage, le dessèchement des branches et enfin une vaste excoriation du tronc. Le parasite peut causer des ravages considérables et réduire de magnifiques châtaigneraies à l'état presque désertique comme nous l'avons constaté en Corrèze aux environs de Brive-la-Gaillarde (Pl. XV, Fig. 1 et 2).

Le lupin inoculé présente macroscopiquement une certaine analogie avec le châtaignier. La fissuration n'est pas aussi constante, mais, à l'endroit inoculé, on remarque toujours une augmentation considérable du diamètre de la tige. La partie épigée et les racines brunissent, mais sans noircir; les feuilles tombent et la plante finit par dépérir sans qu'aucun écoulement se produise.

2° Rapports anatomiques entre le mycélium et les tissus hospitaliers.

D'après PETRI et DUFRÉNOY, la région dans laquelle se développe le champignon est limitée au cambium; c'est pour cette raison que PETRI lui donna le nom de *Phytophthora cambivora*.

Nous avons pratiqué des inoculations en différents endroits de la plantule. Dans les tissus cotylédonaire de la châtaigne, le mycélium se rencontre le plus souvent sous forme cylindrique, qu'il chemine entre les

cellules ou à l'intérieur de celles-ci. Ces derniers filaments intracellulaires peuvent d'ailleurs, au stade initial de leur développement, s'identifier avec des suçoirs. En général, il est très difficile de discriminer s'il s'agit d'une pénétration véritable ou simplement d'une invagination : le plus souvent, en effet, le mycélium détermine une sorte d'incrustation profonde qui peut donner l'illusion d'une disposition intracellulaire; un état d'invagination typique est représenté sur la planche XI, figure 1. Sur la planche XI, figure 2, nous remarquons qu'en *a* le mycélium a déterminé une invagination, tandis qu'en *b* la cellule se trouve transpercée par celui-ci. Les rapports entre le mycélium et la cellule hospitalière semblent conditionnés par l'absence ou la présence de grains d'amidon qui, lorsqu'ils sont en abondance, constitueraient un obstacle à la pénétration du mycélium à l'intérieur de la cellule et à son développement. C'est aussi par l'absence ou la rareté des grains d'amidon que nous expliquons l'importance des renflements intracellulaires tels que nous les rencontrons dans les cellules de l'axe hypocotylé de châtaignier (Pl. XI, Fig. 3). Ces renflements peuvent atteindre des dimensions considérables, à tel point qu'ils occupent souvent tout l'intérieur de la cellule hospitalière et se confondent avec des formes de conservation, ce qui nous a amené dans certains cas à les identifier avec des oogones (Pl. VI, Fig. 1). Ainsi, le terme de suçoirs, employé par différents auteurs, ne peut s'appliquer ici qu'à des diverticules jeunes destinés à devenir intracellulaires à un stade plus avancé de leur développement.

On constate souvent dans les cellules envahies par le mycélium ou dans celles du voisinage la formation de thylles plus ou moins nombreuses; il est possible que leur apparition soit la première réaction des

cellules provoquée par la perturbation physiologique résultant de la présence du parasite.

Passons maintenant aux observations que nous avons pu effectuer sur les tissus du lupin; elles révèlent une grande analogie avec celles auxquelles nous nous sommes livré sur les tissus de châtaignier.

Le mycélium se propage entre les cellules ou les envahit; les filaments et les renflements qui, dans certains cas, sont assimilables aux organes de conservation (Pl. XI, Fig. 4) affectent les formes les plus variées. D'après la planche XI, figure 5, le mycélium se trouve souvent à l'intérieur de la cellule; les différents segments sont alors séparés par des étranglements au niveau de la paroi cellulaire. Mais il arrive aussi, comme c'est le cas dans les tissus de châtaignier, que le mycélium s'incruste intimement dans le corps de la cellule (Pl. XI, Fig. 6 et 7, Pl. XIII, Fig 6). La pénétration du mycélium à travers la paroi est précédée d'une digestion locale de celle-ci, comme nous le fait voir la planche XI, figure 7, en *a*. En cet endroit, quand nous avons employé l'hématoxyline, nous avons remarqué une coloration très intense, caractéristique d'un état mucilagineux. L'orifice de pénétration se consolide par l'apparition d'une sorte de bourrelet cicatriciel et c'est à ce fait que l'on doit attribuer les étranglements du mycélium au niveau de la paroi cellulaire. La planche XIII, figure 6, nous montre combien peut être profonde l'incrustation d'un mycélium dans une cellule et aussi combien peut être prononcé l'étranglement d'un mycélium intracellulaire au niveau de la membrane, qui est ici pourvue d'un bourrelet comme dans le cas général.

Ainsi nous voyons tout l'intérêt qu'il y a à pratiquer des coupes nombreuses et dans les sens les plus divers, de façon à bien connaître les situations respectives

du mycélium et de la cellule, car il est très possible, lors d'un examen rapide, de confondre la position intracellulaire et la position intercellulaire.

Le mycélium possède un pouvoir de dissociation considérable, probablement de nature physique et chimique, qui nous est révélé par l'examen de la planche XI, figure 8, d'après laquelle nous constatons que la cuticule elle-même peut être disjointe, et par celui de la planche XI, figure 9 et 10, où nous voyons le mycélium transpercer cette cuticule pour s'échapper au dehors et passer ainsi de l'état intracellulaire à l'état aérien.

Le mycélium n'est pas confiné au cambium du châtaignier; il s'étend au delà puisque nous l'avons rencontré dans le cylindre central.

Nous citerons seulement pour mémoire les observations que nous avons faites sur d'autres végétaux, tels que le chêne, le noisetier, la féverole..., qui nous ont permis de confirmer les résultats que nous venons d'exposer.

3° Modifications cytologiques et physiologiques des tissus envahis.

Nos observations ont été effectuées parallèlement sur les tissus de châtaignier et sur ceux de lupin.

A. *Cotylédons*. — La structure cytologique des cellules cotylédonaire d'une châtaigne indemne est plus ou moins différenciée suivant la région anatomique que l'on considère ou suivant les fonctions physiologiques de l'une ou de l'autre de ces cellules.

La planche XII, figure 1, nous montre un système vacuolaire à vacuoles de grosseurs différentes dans une cellule saine; le chondriome se présente sous forme de nombreux granules dont une partie est différenciée

en plastes; quelques grains d'amidon simples ou composés sont également visibles, ainsi qu'un précipité vacuolaire.

Sur la planche XII, figure 2, nous voyons une cellule provenant d'une région plus profonde des tissus cotylédonaire; cette cellule est bourrée de grains d'amidon à ce point que le noyau est ici de dimensions réduites et que, d'une façon générale, les noyaux subissent des déformations considérables. Le chondriome est comme par ailleurs granuleux, à l'exception cependant de quelques formes annulaires qui sont dues probablement à l'action du fixateur. Quant au système vacuolaire, il est représenté par une seule grosse vacuole refoulée à l'une des extrémités de la cellule.

La présence du mycélium dans ces tissus se traduit tout d'abord, comme le montre la planche XII, figure 3, par un morcellement du système vacuolaire. Les mitochondries conservent en majeure partie les mêmes formes que dans les cellules saines, mais les granules ont augmenté de grosseur. Les autres formes que nous avons observées en dehors de celles-ci proviennent aussi d'altérations pathologiques : l'aspect virgulaire n'est pas rare et la forme annulaire est fréquente; quant aux formes filamenteuses, il n'y en a ici que quelques exemples alors que c'est le cas général dans les cellules saines des autres tissus du châtaignier en dehors des tissus cotylédonaire. Les vacuoles, dans lesquelles on distingue rarement des précipités, sont petites et nombreuses.

Les grains d'amidon, principalement les plus petits, sont souvent agglomérés par paquets; il est vraisemblable qu'une partie d'entre eux a déjà été digérée ou hydrolysée, surtout si l'on en juge d'après la réaction iodo-iodurée qui produit une gamme de teintes passant du bleu au violet, au rouge et même au brun.

Cette réaction, qui donne fréquemment des résultats au voisinage du chondriome, nous a permis de constater que les grains d'amidon, qui ont subi une digestion, laissent pour résidu une enveloppe annulaire ou elliptique se colorant elle-même, mais plus faiblement, par la solution iodo-iodurée.

Les noyaux denses et relativement petits dans une cellule saine s'altèrent dans une cellule atteinte en prenant un développement anormal. Le nucléoplasme se relâche, perd de son homogénéité, devient réticulé et peut se confondre avec le protoplasme environnant; le nucléole diminue de volume et sa teinte, après coloration, se distingue mal de celle du nucléoplasme.

Disons un mot de la structure cytologique du mycélium dans le tissu envahi : les graisses y sont assez abondantes, les vacuoles sont de dimensions et de formes variées, le chondriome est constitué de courts bâtonnets et de granules sphériques (Pl. XII, Fig. 3); quand le noyau du mycélium est bien différencié, on distingue un nucléole baignant dans un nucléoplasme homogène ou finement granuleux.

Si nous voulons comparer les effets pathologiques que le champignon détermine tant sur les tissus cotylédonaire de la châtaigne que sur ceux du lupin, nous constatons de prime abord une certaine analogie des structures cytologiques dans les deux cas.

Les figures 1 et 2 de la planche XIII sont la reproduction de coupes effectuées dans des cotylédons de lupin envahis; la première nous montre une grande accumulation de composés phénoliques, en particulier de tanins, colorables par la potasse, par le bichromate de potassium, par la liqueur de Braemer, par le bleu de méthylène et par le perchlorure de fer; le même phénomène, c'est-à-dire l'accumulation des tanins, ne saurait être imputé à la même cause dans

la châtaigne, puisque les composés phénoliques sont abondants, même dans les cellules saines. Nous fondant sur les réactions ci-dessus et sur le fait que les fixateurs de Regaud et de Meves insolubilisent ces composés, nous ne croyons pas qu'ils aient une parenté avec les oxyflavons cristalloïdes étudiés par Guilliermond et par Gautheret.

Les chloroplastes perdent progressivement leur forme polygonale (Pl. XIII, Fig. 2) : en s'arrondissant, ou bien ils se désagrègent en une multitude de granules ou bien ils restent homogènes sans structure. La réaction iodo-iodurée s'étend sur les composés phénoliques qu'elle colore en violet, prouvant ainsi que ces composés s'imprègnent de produits d'amylyolyse.

Le chondriome est en général constitué de sphérules de différentes dimensions groupées parmi les chloroplastes dans une cellule atteinte et au contraire réparties régulièrement dans une cellule saine où l'on rencontre d'ailleurs aussi des mitochondries filamenteuses. Ces sphérules s'agglomèrent à mesure que l'altération progresse, grossissent et finissent par se détériorer elles-mêmes.

Si les altérations sont comparables dans les tissus des deux plantes que nous avons étudiées, il est cependant à remarquer que le noyau du lupin paraît plus sensible que celui du châtaignier; nous reprendrons cette question ultérieurement, quand nous en arriverons à l'examen du noyau des cellules appartenant à la racine.

B. *Axe hypocotylé*. — Si nous considérons la structure cytologique d'une cellule indemne de l'axe hypocotylé dans le châtaignier, nous y trouvons des tanins en quantité plus ou moins grande, sous les formes les plus diverses (Pl. XII, Fig. 4).

Le chondriome est constitué par des mitochondries

filamenteuses et des mitochondries granuleuses qui sont d'ailleurs moins nombreuses que les premières; les formes granuleuses se trouvent le plus souvent dans les cellules riches en tanin. Les noyaux sont en général petits, de formes variées, denses, homogènes et pourvus de nucléoles très nets.

Comme le montre la planche XII, figure 4, la région étudiée est assez riche en gros grains d'amidon simples ou composés; leur présence dans ce tissu provient vraisemblablement de ce que la plantule était relativement jeune au moment de l'inoculation et de la fixation.

L'état cytologique d'une cellule saine de la même région dans le lupin diffère de la précédente en ce que le noyau est beaucoup plus volumineux et que la forme filamenteuse des mitochondries y est presque seule représentée (Pl. XIII, Fig. 3); celles-ci sont, sur la figure, en état de différenciation en plastes : amyloplastes ou chloroplastes. Les corpuscules lipoïdiques sont très nombreux (Pl. XIII, Fig. 4-5), même dans la substance du chloroplaste, mais le tanin fait complètement défaut dans cette région. L'altération pathologique du système mitochondrial ne révèle pas de différence essentielle qu'il s'agisse du châtaignier ou du lupin. Dans les deux cas, le chondriome filamenteux devient sphérique (Pl. XII, Fig. 5, Pl. XIII, Fig. 6-7); il peut aussi parfois devenir annulaire ou prendre la forme de virgule. Cette diversité de formes du chondriome ne semble pas être déterminée par la qualité du fixateur, car elle apparaît quel que soit le fixateur mitochondrial employé.

Le morcellement du système vacuolaire est bien plus prononcé dans les cellules du châtaignier que dans celles du lupin.

Le mycélium qui se trouve dans l'axe hypocotylé

contient le plus souvent de très belles mitochondries en forme de bâtonnets ou de fins filaments, aussi bien dans le lupin que dans le châtaignier. Les noyaux sont, soit homogènes, soit granuleux avec un nucléole nettement distinct.

C. *Racine*. — L'état cytologique des cellules saines de la racine diffère de celui de l'axe hypocotylé par le nombre bien plus abondant des grains d'amidon; en outre les vacuoles y sont souvent emplies de tanin (Pl. XII, Fig. 6).

Le chondriome est généralement constitué par des granules, quelquefois cependant par des filaments ou des bâtonnets; la planche XII, figure 7, nous donne l'exemple d'un chondriome formé exclusivement de granules, malgré l'absence de grains d'amidon.

Le noyau, sans forme définie, possède toujours un nucléole nettement visible.

Si nous comparons cette structure cytologique avec celle de la racine de lupin, nous constatons une première différence résultant de l'existence de tanin dans l'une des plantes, comme nous venons de le dire, et de l'absence totale de cette substance dans l'autre. Par contre, nous trouvons dans le lupin de nombreux corpuscules lipoïdiques (Pl. XIII, Fig. 8) et de grosses gouttes de graisse, souvent en amas coralloïdes.

Le chondriome apparaît généralement sous forme de bâtonnets (Pl. XIII, Fig. 8) dont les uns demeurent à l'état de mitochondries et dont les autres se différencient en plastes, comme le montre la planche XIII, figure 9, où nous constatons des ébauches de grains d'amidon.

Le noyau est, comme dans les autres tissus de ce végétal, volumineux, homogène et pourvu d'un gros nucléole.

Le tissu de la racine de lupin altéré par le parasite

offre encore une fois une analogie avec le tissu de châtaignier, surtout en ce qui concerne la modification mitochondriale. Dans le châtaignier, les mitochondries se gonflent avant de subir une désagrégation en un grand nombre de granules de petite taille et de formes variées (Pl. XII, Fig. 8); dans le lupin, le chondriome, qui est, à l'état sain, filamenteux, se présente sous forme de mitochondries sphériques dans les cellules altérées (Pl. XIII, Fig. 10).

La dégénérescence des plastes apparaît aussi bien dans l'un des tissus que dans l'autre.

Le système vacuolaire de la racine de châtaignier subit une fragmentation plus accusée que dans les tissus du lupin.

Le chondriome du mycélium parasitaire se trouve beaucoup plus souvent sous la forme filamenteuse dans les tissus de la racine du lupin que dans ceux du châtaignier; toutefois, la structure filamenteuse y est moins fréquente que dans les autres tissus de ces deux végétaux (Pl. XI, Fig. 2).

Notre examen comparatif ne comportant que quelques observations sur le noyau et sur le sort qui lui est réservé dans les tissus parasités, nous allons reprendre cette étude avec plus de détails.

En dehors de leur augmentation de taille, des différences de chromophilie nucléaire et nucléolaire, de leur confusion finale avec le protoplasme, les noyaux des cellules envahies chez le châtaignier ne semblent pas subir les mêmes modifications que celles que nous avons observées dans les noyaux des régions infectées du lupin, qui révèlent des altérations notables.

Sur les figures 11a et b, planche XIII, qui représentent des noyaux de cellules radicales, nous remarquons tout d'abord une forte vacuolisation de la substance nucléaire autour du nucléole et en outre

une condensation très nette de la chromatine en certains endroits du réseau nucléoplasmique; cette structure réticulée, mais sans accumulation de la chromatine par points, était d'ailleurs nettement visible dans les noyaux de tissu indemne. Le nucléole étant très réfringent, son centre est plus clair que la périphérie.

A un stade d'altération plus avancé (Pl. XIII, Fig. 11c), nous voyons un début d'épaississement de la membrane nucléaire, à l'intérieur de laquelle se groupent en forme de couronnes des amas de chromatine (Pl. XIII, Fig. 11d et e); ceux-ci, à partir de ce moment, perdent leur affinité pour la fuchsine basique et retiennent plus volontiers le vert acide. Le nucléoplasme se vacuolise et prend une structure réticulée à larges mailles.

L'altération finale se traduit par une accumulation périphérique de la chromatine, tapissant intérieurement la membrane qui est ici très distincte; au centre, ne subsistent plus que quelques traces de chromatine résiduelle (Pl. XIII, Fig. 11f).

Le phénomène de nucléolyse, dans lequel les noyaux finissent, après avoir augmenté de volume, par se fondre avec le reste du protoplasme de la cellule, se rencontrent beaucoup moins souvent dans les tissus de lupin (Pl. XIII, Fig. 11g) que dans ceux de châtaignier.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

ÉTUDE COMPARATIVE DU PHYTOPHTHORA CAMBIVORA AVEC LE PHYTOPHTHORA ERYTHROSEPTICA

Nous résumerons dans ce chapitre les principales observations que nous avons faites au cours de la présente étude; nous avons non seulement tenté de combler quelques lacunes, mais encore cherché à trouver la solution de certains problèmes en confrontant les résultats obtenus par les divers auteurs qui nous ont précédé avec les conclusions auxquelles nous avons nous-même abouti.

I. — Le *Phytophthora cambivora* se développe sur des milieux très divers. Nous rappelons que la présence des peptones dans les milieux liquides nous a permis d'obtenir une croissance particulièrement rapide du mycélium; nous avons constaté que l'augmentation de poids sec pendant un temps déterminé avait été bien plus importante dans les solutions peptonées que dans celles qui ne l'étaient pas.

Dans les solutions au saccharose ou au glucose, les membranes subissent souvent un épaissement pariétal considérable. Alors qu'il est nécessaire, chez le *Phytophthora cambivora*, d'attendre environ quatre mois pour que le phénomène se produise, il suffit de quelques jours pour obtenir les mêmes épaisissements chez le *Phytophthora Cinnamomi* repiqué sur quaker-oat. Les membranes ainsi épaissies se com-

posent principalement de cellulose et de chitine.

Nous tenons à mentionner ici que le seul milieu liquide qui ait donné naissance à des œufs est le milieu « A » dont nous avons fait connaître la composition.

II. — Nous avons pu mettre en évidence l'« accroissement perforant » chez le *Phytophthora cambivora*, phénomène déjà constaté chez les Saprologniées.

III. — Le caractère spécifique du *Phytophthora cambivora* consiste en ce que plusieurs sporanges se suivent sur le même filament, quelquefois à intervalles tellement rapprochés qu'ils peuvent être emboîtés les uns dans les autres. Cependant il arrive aussi, contrairement à l'opinion de PETRI, que les sporanges soient rattachés par un court pédicelle à l'hyphe principal.

Ce savant indique que le sporange contient environ 20 spores; de notre côté, ayant observé l'éclatement d'un sporange en chambre de Van Tieghem, nous n'avons pu en compter que 10. Les deux résultats ne sont pas en opposition absolue, car il est possible qu'une partie du protoplasme se soit échappée du sporange sans se différencier en spores.

Contrairement aux dessins qui ont été publiés, les spores ne sont pas réniformes et ne possèdent pas deux cils vibratiles de longueur égale partant de la partie concave; nous avons en effet constaté à maintes reprises qu'elles étaient de forme allongée et qu'elles possédaient 2 cils vibratiles opposés et de longueurs différentes.

IV. — Les corps intercalaires sont rarement isolés sur un mycélium et se trouvent généralement à la suite les uns des autres. Ils ne doivent pas être confondus avec des chlamydospores parce que leur membrane n'est pas plus épaisse que celle du mycélium.

V. — Depuis PETRI, qui, en 1925, obtint des œufs en culture pure, il n'avait été possible d'arriver au même résultat qu'exceptionnellement. Nous avons donc cherché à faire apparaître des œufs en nombre important et le plus rapidement possible; à cet effet, nous avons employé le milieu de Petri gélosé ou des milieux légèrement différents et avons pu ainsi réduire le temps minimum de l'apparition des œufs à 7 jours; nous avons en outre constaté que la formation des œufs s'effectuait de préférence sur les milieux d'inanition et d'autant plus facilement que ces milieux étaient plus pauvres. Il est indispensable, pour réussir ces expériences, que les cultures soient soumises régulièrement à des écarts de température importants, ce que nous avons réalisé en plaçant nos tubes dans un lieu où la température atteignait environ 13° pendant la nuit et 23° pendant le jour.

Les anthéridies se présentant sous la forme amphigyne, les œufs de *Phytophthora cambivora* entrent dans le même groupe que ceux du *Phytophthora infestans*, du *Phytophthora erythroseptica*, etc... Ils diffèrent donc du *Phytophthora Cactorum* dont les anthéridies sont exclusivement paragynes et d'autres *Phytophthora* tels que le *Phytophthora Syringæ* ou le *Phytophthora Porri* dont les anthéridies sont tantôt amphigynes tantôt paragynes.

VI. — A l'extrémité du thalle, les vacuoles apparaissent généralement sous forme de gouttes; ce n'est que dans une région plus éloignée de la partie apicale qu'elles sont filamenteuses, contrairement à une opinion émise. La coalescence de ces vacuoles donne naissance à de grandes vacuoles dans la partie postérieure du thalle.

Nous dirons seulement des mitochondries qu'elles sont disposées longitudinalement dans le mycélium,

indifféremment dans le sporange et qu'elles se présentent dans l'œuf sous l'aspect soit de bâtonnets, soit de granules sphériques.

L' Amitose est le mode de division normale des noyaux dans le mycélium et le sporange; la mitose vraie a pu être mise en évidence seulement dans l'œuf.

Nous n'avons jamais trouvé de corpuscules métachromatiques ni dans le mycélium, ni dans les sporanges, ni dans les œufs.

Les stades de la fécondation ont été suivis depuis la naissance de l'oogone jusqu'à la formation dans l'oosphère du noyau de fusion, qui résulte de l'union d'un seul noyau mâle avec un seul noyau femelle, comme c'est le cas chez certaines Cystopées et chez le *Phytophthora erythroseptica*.

La membrane de l'œuf est un composé de callose et de cellulose avec prédominance de cellulose dans l'endospore et de callose dans l'exospore.

VII. — L'étude pathologique, qui comprend des observations macroscopiques et microscopiques, a été faite en comparaison avec une plante herbacée, le lupin, expérimentalement infecté; elle a porté sur les cotylédons, sur les tiges et sur les racines.

L'observation macroscopique montre que la présence du *Phytophthora cambivora* détermine en dernier lieu dans les tissus du châtaignier un noircissement, puis une sécrétion de liquide noir, tandis que, dans le lupin, elle produit seulement un jaunissement, tout au plus un brunissement des tissus; dans l'un et l'autre cas, on constate une hyperplasie très nette au point d'inoculation.

L'examen microscopique nous révèle que le parasite forme des renflements mycéliens aussi bien dans le châtaignier que dans le lupin et peut prendre une localisation intra ou intercellulaire, selon le degré de la

résistance des cellules qui semble accrue par l'abondance des grains d'amidon. L'altération de la structure des cellules se traduit par une désagrégation des chloroplastes, par la digestion des grains d'amidon, par une agglomération de gouttelettes graisseuses existant déjà dans les cellules saines, et enfin, chez le lupin, par l'apparition de tanins dans les tissus. La présence de tanins chez le châtaignier ne semble pas due à l'influence du parasite, puisque même les tissus indemnes en contiennent en grande quantité.

Le morcellement du système vacuolaire est plus prononcé dans les cellules du châtaignier que dans celles du lupin. Le chondriome, dans les cellules atteintes de ces deux plantes, finit par prendre la forme de granules. La nucléolyse complète est plus fréquente dans les cellules infectées du châtaignier que dans celles du lupin.

*
* *

Du point de vue morphologique il nous a été donné de constater la grande similitude qui existait entre le *Phytophthora erythroseptica* et le *Phytophthora cambivora*. Les sporanges et les corps intercalaires sont identiques; les œufs, non plus que le processus de leur évolution, ne diffèrent pas dans les deux cas. La dissemblance la plus manifeste consiste en ce que les œufs de *Phytophthora erythroseptica* s'obtiennent très aisément tandis que ceux de *Phytophthora cambivora* ne sont produits qu'avec la plus grande difficulté.

Le mérite d'avoir décrit exactement la reproduction sexuelle chez le *Phytophthora erythroseptica* revient, comme nous l'avons dit, à MURPHY. Si nous avons cru devoir reprendre l'ensemble de cette étude, c'est

afin, tout en obtenant une confirmation des faits énoncés, de pouvoir établir un parallèle entre les deux *Phytophthora* du point de vue cytologique.

Comme matériel, nous nous sommes servi de chambre de Van Tieghem, de façon à suivre l'évolution du champignon à chaque instant, et, partant, de le fixer au moment qui nous semblait le plus propice; comme milieu, le bouillon de carotte gélosé nous a paru parfaitement convenir. Nos coupes ont été effectuées sur des œufs d'âges divers variant de un à huit jours.

La première série d'expériences auxquelles nous nous sommes livré ne nous a pas donné de résultats bien intéressants parce que les œufs après 48 heures avaient tendance à dégénérer; ayant pensé que l'insuccès venait peut-être de ce fait que nos souches étaient anciennes, nous avons inoculé plusieurs pommes de terre que nous avons ensuite abandonnées pendant 3 mois. Après prélèvement d'une parcelle de ces pommes de terre infectées et repiquage sur le milieu de carotte gélosé, nous avons été bien plus heureux : nous avons pu suivre tous les stades de la fécondation et voir en particulier comment se comportaient les noyaux.

Comme fixateurs, nous avons employé le Bouin et le Meves; comme colorants, l'hématoxyline ferrique et le Flemming (triple coloration).

Après MURPHY, nous avons pu voir les mitoses des noyaux périphériques et la division du noyau central, la dégénérescence de ceux-ci à l'exception d'un seul, la présence d'un tampon épais à la base de l'oogone (thick plug), l'existence d'une papille réceptrice, etc... Nous avons retrouvé dans l'oosphère le cœnocentre de STEVENS que MURPHY désigne sous le nom de « central plasm » en ne faisant d'ailleurs que le mentionner. Tout semble donc se passer ici à peu près comme dans

le *Phytophthora cambivora*. Cependant nous n'avons pu, chez ce dernier, constater la division du noyau central, pas plus d'ailleurs que la présence du tampon ni de la papille; nous ne saurions néanmoins en conclure que ces stades n'existent pas.

Les points communs entre les deux champignons sont les suivants : division des noyaux périphériques, apparition d'un cœnocentre auquel est accroché un noyau, union d'un seul noyau mâle et d'un seul noyau femelle. Notons enfin que l'anthéridie germe de temps en temps, ce qui nous permet de rapprocher le dessin de la figure 18d de celui de la planche VI, figure 3.

Au cours de la différenciation de l'oosphère, apparaît au centre une masse irrégulière et épaisse : le cœnocentre. Certains auteurs pensent qu'il exerce une attraction sur le noyau femelle et sur le tube fécondateur; ils lui attribuent une fonction nutritive en ce qui concerne les deux noyaux mâle et femelle, qui s'agrandissent avant de s'unir.

Nous avons été tenté à plusieurs reprises de confondre ce cœnocentre avec un noyau, surtout quand nous avons employé l'hématoxyline ferrique. L'usage de la triple coloration de Flemming a démontré l'erreur, car, si les noyaux absorbent plus volontiers la safranine en les colorant en rouge-violet, le cœnocentre, par contre, prend une teinte intermédiaire entre le violet et le jaune due à l'influence du violet de gentiane et de l'orange G; le violet occupe plutôt la partie centrale et le jaune les bords. La coloration de cette masse homogène, tout en étant plus intense que celle du protoplasme (normalement coloré en jaune) s'en rapproche néanmoins, ce qui nous incite à croire que le cœnocentre est en partie composé d'un protoplasme dense et sans vacuoles.

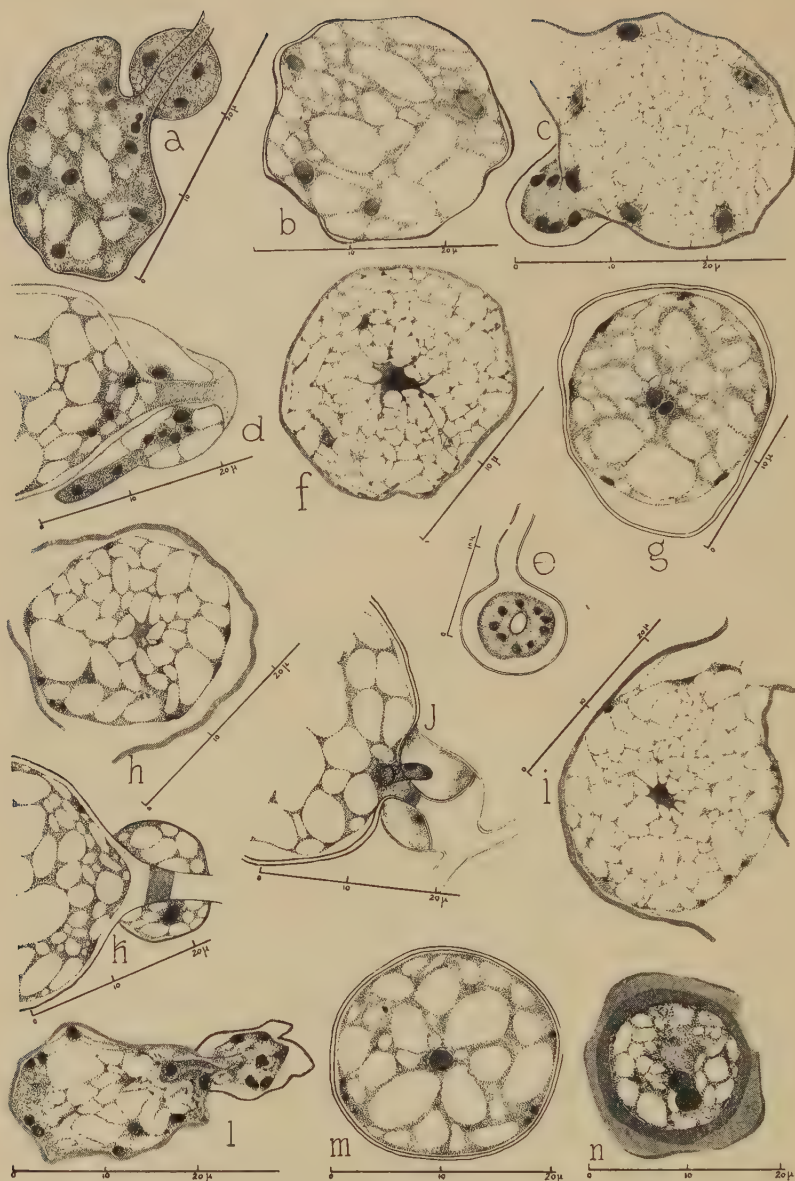


FIG. 18. — *Phytophthora erythroseptica*.

a) Œuf jeune. — b et c) Divisions de noyaux. — d) Germination de l'antheridie. — e) Coupe transversale de l'antheridie. — f) Coenocentre et noyaux périphériques. — g) Formation des noyaux fils. — h) Noyaux fils dont l'un est accroché au coenocentre. — i) Noyau femelle accroché au coenocentre. — j) Papille réceptrice pénétrant dans l'antheridie. — k) Tampon épais à la base de l'oögon. — l) Tube fécondateur pénétrant dans l'oöspère. — m) Noyau femelle. — n) Noyaux en fusion.

On peut admettre que le cœnocentre serait produit par une accumulation tant de protoplasme que de chromatine provenant des noyaux périphériques, solution plausible si l'on fait intervenir la coloration non seulement jaune mais violette de la partie centrale, dont nous parlions plus haut. Il devient cependant alors difficile d'expliquer la présence simultanée dans certains cas, d'une part de noyaux végétatifs en parfait état de conservation, et, d'autre part, d'un cœnocentre nettement constitué (Pl. IX, Fig. 2), à moins que certains noyaux n'aient dégénéré, sans que l'observateur s'en soit rendu compte.

Nous donnons ci-contre toute une série de dessins relatifs à la fécondation du *Phytophthora erythro-septica*, pour permettre la comparaison avec le *Phytophthora cambivora* (Fig. 18).

BIBLIOGRAPHIE

- ALLAIN (A.). — Contribution à l'étude du *Phytophthora cambivora* (C. R. de la Soc. de Biol., 1933, t. CXIII, p. 1405).
— La formation des œufs du *Phytophthora cambivora* en culture pure (C. R. de la Soc. de Biol., 1934, t. CXV, p. 1521).
— Cytologie de l'œuf du *Phytophthora cambivora* (C. R. de la Soc. de Biol., 1934, t. CXVII, p. 778).
- ARNAUD (G. et M.). — Traité de Pathologie végétale (Lechevalier, 1932).
- ASCHERSON ET GRAEBNER. — Synopsis der Mitteleuropäischen Flora (Leipzig, 1911, Bd. IV, p. 440).
- ASHBY (S.-F.). — The production of sexual organs in pure culture of *Phytophthora Cinnamomi* Rands and *Blepharospora cambivora* Petri (Trans. Brit. Mycol. Soc., vol. XIV, oct. 1929).
- BARBUT. — Culture et maladie du châtaignier dans l'Aude (Carcassonne, 1898).
- BARCAGLI (P.). — Notizie intorno alcune malattie del castagno (Atti de la R. Acc. dei Georgofili, vol. XXII, p. 15, 1899).
- BARRETT (J.-T.). — *Pythiacystis* related to *Phytophthora* (Phytopathology, 7, 1917).
- BARTHELET (J.). — Sur une maladie des *Rhododendrons* (Revue de Path. Végét. et d'Entomol. agric., t. XXI, 1934).
- BARY (A. de). — Zur Kenntniss der Peronosporen (Bot. Ztg. Jhg. 39, n° 33-39).
— Ueber Schwärmsporen-Bildung bei einigen Pilzen (Ber. Verhandl. Naturf. Gesell., Freiburg i. B. 2, 1861).
— Remarques sur le développement de quelques champignons parasites. (Ann. Sc. Nat. Bot., 4^e série, t. XX).
— Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze (Dritte Reihe Erysiphae, 23-52, 1871).
— Untersuchungen über die Peronosporen und Saprolegnien und die Grundlage eines natürlichen Systems der Pilze

- (Abhdlg. Senckenb. Naturf. Ges., Bd. 12, Hf. 2/4, 1881).
— Morphologie und Physiologie der Pilze (Leipzig, p. 14, 1884).
- BERLÈSE (A.-N.). — Ueber die Befruchtung und Entwicklung der Oosphäre bei den Peronosporen (Jahrb. f. w. Bot., vol. XXXI, 1898).
- BLAKESLEE (A.-F.). — Sexual reactions between hermaphroditic and dioecious Mucors (Biol. Bull., 29, p. 87-98, 1915).
— Conjugation in the heterogamic genus Zygorhynchus (Myc. Centr. bl., 2, p. 211-244, 1913).
- BONDARZEW (V.-N.) et MONTEVERDE. — Phytophthora infestans (Mont.) de By, auf Tomaten (Bul. de malad. de plantes de l'U. R. S. S., nr. I; 1926).
- BREFELD (O.). — Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie (IX. Münster i. W., 1891).
- BRIOSI E FARNETI. — Sulla moria dei castagni (Male dell'inchioistro). (Atti dell'Ist. bot. dell'Univ. di Pavia, ser. II, vol. XIII, 1907).
— Interno alla causa della moria dei castagni (Male dell'inchioistro), ed ai mezzi per combatterla : 2-a nota preliminare (*ibid.*, vol. XIV, p. 47, 1909).
— Riproduzione artificiale della moria dei castagni (Male dell'inchioistro). Rendiconti della R. Acc. dei Lincei., vol. XX, p. 629, 1911).
— La moria dei castagni (Male dell'inchioistro). Osservazioni critiche ai signori Griffon et M. Maublanc (Atti dell'Istituto Bot. dell'Univ. di Pavia, ser. II, vol. XV, p. 43).
- BRUJIN (H.-L.-G.). — The saprophytic life of Phytophthora in the soil (Meded. Landbouwhoogesch., Wageningen, 244 : 37; 1922).
— Oospores of Phytophthora infestans. Mont. de By (Rep. Internat. conf. Phytopath. and Econ. Entomol. Holland., 1923).
— The Overwintering of Phytophthora infestans (Mont.) de By. (Phytopathology, febr. 1926, vol. XVI, Nr. 2).
- BRUNSWICK (H.). — Ueber die Mikrochemie der Chitosanverbindungen (Biochem. Zschft., XCIII, 1921).
- BUISMAN (C.-J.). — Root rots caused by Phycomycetes (Mededeel. van het Phytopath. Labor. « Willie Commelin Schotten », XI, mei 1927, Baarn).
- CALMETTE (A.), NEGRE (L.), et BOQUET (A.). — Manuel tech-

- nique de microbiologie et sérologie (Masson et C^{ie} éd., Paris, 1926).
- CARBONE (D.) E ARNAUDI (C.). — L'Immunità nelle piante (Milan, A. VIII, p. 94, 95, 96, 1930).
- CASSAIGNE (M^{lle}). — Sur l'origine des vacuoles (C. R. Ac. Sc., t. CXCII, 1931).
- Origine et évolution du vacuome chez quelques champignons (Rev. gén. Bot., t. XLIII, 1931).
- CELLI. — Mission du Ministro di Agricoltura, continuée par Gibelli, 1870.
- CHAZE (J.). — Essai de culture pure d'une Saprolegniacée (C. R. Acad. Sc., 1924).
- Essai de culture pure d'une Saprolegniacée (Bull. Soc. Mycol., 1925).
- Les Saprolegniacées : leur importance dans les études cytologiques et physiologiques depuis 1924. Nouvelle technique de culture pure de ces champignons (Bull. Soc. bot., t. LXXX, 1933).
- CHESTER (S.). — A comparative study of the three Phytophthora diseases of Lilac and their pathogens (Journ. of the Arnold Arboretum, vol. XIII, 1932).
- CLAUSSEN (P.). — Ueber Entwicklung und Befruchtung bei Saprolegnia monoïca (Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch., vol. 26, 1908).
- CLINTON (G.-P.). — Downy mildew or blight, Phytophthora infestans (Mont. de By. of potatoes. II. Com. Agr. Exp. Sta. Ann. Rept., 1905, 1906).
- Artificial cultures of Phytophthora with special reference to oospores (Ann. Rept., 1907, 1908, 1909).
- Oospores of potato blight, Phytophthora infestans (Ann. Rept., 1909, 1910, 1911).
- COLLINS (E.-J.). — The physiological aspect of the incidence of late blight (Phytophthora infestans) of potatoes (Abs. in Proc. Linn. Soc., London. 137 Th., session 1925).
- COMBES (R.). — La vie de la cellule végétale (A. Colin, éd., 1927-1928.)
- CORNU (M.). — Note sur le Phytophthora infestans de Bary et les spores dormantes qui l'accompagnent (Pythium vexans de Bary et Artotrogus Hydnosporus Mont.) (Bul. Soc. Bot. de France, vol. 28, ser. 2, vol. 3, 1881).
- Étude sur les Péronosporées (C. R. Acad. Sc., t. II, 1882).

- CRIÉ. — Rapport sur la maladie des Châtaigniers en Bretagne (Bull. du Ministère de l'Agriculture, 1894, 1895, 1898, 1900).
- CZAPEK (F.). — Biochemie der Pflanzen (Iéna, 1923).
- DA CAMARA PESTANA. — La maladie des châtaigniers. Gangrène humide de la racine du châtaignier (Bull. de la Soc. Portugaise des Sc. Nat., vol. I, p. 55, 1907).
- DANGEARD (P.). — Recherches de biologie cellulaire. Évolution du système vacuolaire chez les végétaux (Le Botaniste, série XV, 1923, avec Biographie).
- DANGEARD (P.-A.). — Mémoire sur la terminologie des éléments cellulaires et son application dans l'étude des champignons (Le Botaniste, 12, 325, 1931).
- La fécondation nucléaire chez les Mucorinées (C. R. Acad. Sc., 142, 1906).
- Le chondriome des Saprologénies, sa nature et son rôle (Bull. Soc. Mycolog. de France, 1916).
- Nouvelles recherches sur le système vacuolaire (Bull. Soc. Bot. de France, 1916).
- Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome (C. R. Ac. Sc., 1919).
- La structure de la cellule végétale (C. R. Ac. Sc., 1920).
- DANGEARD (P.-A.) ET KIN CHOU TSANG. — Recherches sur les formations cellulaires contenues dans le cytoplasme des Péronosporées (C. R. Acad. Sc., vol. 182, 1926, p. 1256 et Le Botaniste, série XVII, p. 365, 1926).
- DAVIS (B.-M.). — The fertilisation of *Albugo candida* (Bot. Gazette, vol. XXIX, 1900).
- DAY (W.-R.). — The ink disease in England (Per. of Imper. Forestry Inst., Oxford, vol. VI, n° 2, p. 182, 1932).
- DELACROIX (E.). — Les maladies des châtaigniers en France (étude préliminaire). (Bull. de la Soc. mycologique de France, vol. XIII, p. 242, 1897).
- DELACROIX ET MAUBLANC. — Maladie des plantes cultivées (Bai lière, éd., 1926).
- DOP (P.) ET GAUTIÉ (A.). — Manuel de Technique botanique (J. Lamarre, éd., Paris, 1928).
- DRECHSLER (Ch.). — Repetitional Diplanetism in the genus *Phytophthora* (Journ. of Agricultural research, vol. 40, n° 6, Washington, D. C., March 15, 1930, p. 557-573).
- DUCOMET (V.). — Recherches sur le développement de quelques

- champignons parasites à thalle subcuticulaire (Paris, 1907).
- Contribution à l'étude de la maladie du châtaignier (Ann. École Nat. d'agric. de Rennes, t. III, 1909).
- DUFRENOY (J.). — Sur la cytologie du *Blepharospora cambivora* (C. R. Soc. Biol., 1922).
- Les maladies des arbres causées par des champignons du type *Phytophthora* (Rev. Bot. appliquée et d'Agron. coloniale, vol. IV, n° 40, 1924).
- La maladie de l'encre du châtaignier (Ann. de l'Office Agr. Rég. du Sud-Ouest, fasc. X, Bordeaux, 1925).
- La cytologie du *Blepharospora cambivora* Petri (C. R. de la Soc. de Biol., 17 avril 1926, t. XLIV, p. 997).
- La maladie de l'encre des châtaigniers (Rev. gén. des Sciences, 15-30 septembre 1926).
- Observations sur les modifications pathologiques de la forme des vacuoles des cellules végétales (Ann. des Epiphyties, mai-juin 1928).
- La lutte contre la maladie des châtaigniers (Ann. des Epiphyties, p. 25, 1930).
- Les modifications pathologiques de la structure des cellules végétales (Ann. de l'Institut. nat. agron., t. XXIII, Paris, 1930, p. 50).
- Les maladies des châtaigniers (Extr. de « l'Arbre et l'Eau ». XX^e Congrès annuel, 1931, Limoges, 1932, p. 93).
- Reconstitution par les châtaigniers japonais des châtaigneraies détruites par la maladie de l'encre (Congrès morbihannais de la forêt et du châtaignier. P. 57, 1932).
- EICHHORN (A.). — La mesure du pH cytoplasmique des Végétaux; les méthodes, les résultats (Bull. Hist. appliquée à la physiol. et à la path., 1927).
- Sur la notion de prochromosomes et de chromocentres (C. R. Soc. Biol., t. CIV; 1930).
- Aperçus sur le noyau à l'état quiescent (Rev. gén. Bot., t. XLII, 1930).
- Sur le devenir des principaux éléments nucléaires au cours de la mitose (Rev. gén. Bot., t. XLIII, 1931).
- Chromocentres et prochromosomes : leurs relations réciproques avec les chromosomes (Rev. gén. de Bot., t. XLIV, 1932).
- EICHHORN (A.) ET FRANQUET (R.). — A propos de la réaction nucléaire de Feulgen (C. R. Soc. Biol., t. CXVII, 1934).

- EMBERGER. — Recherches sur l'origine et l'évolution des plastides chez les Ptéridophytes, contribution à l'étude cytologique de la cellule végétale (Arch. de Morphol. gén. et exp., 1921. Thèse de Doct. ès Sc. de la Faculté de Lyon).
- FARNETI (R.). — Norme pratiche per combattere la malattia dell'inchiostro nel castagni (Riv. di Pathol. Veg., 1913).
- FARNETI (R.), LISSONE (E.-G.), MONTEMARTINI (L.). — La resistenza del castagno giapponese alla malattia dell'inchiostro. Ricostituzione dei castagni distrutti dalla moria (Riv. di Pathol. Veg., 1913).
- FAWCETT (H.-S.). — Two fungi as casual agents in gummosis of lemon trees in California (Phytopathology, 3, 1913).
- The known distribution of *Pythiacystis citrophthora* and its probable relation to mal di gomma of citrus (Phytopathology, 5, 1915).
- A *Pythiacystis* on avocado trees (Phytopathology, 6, 1916).
- *Pythiacystis* and *Phytophthora*. (Phytopathology, 80, 1920).
- The temperature relation of growth in certain parasitic Fungi (Univ. of Calif. Publ. Agr. Scienc., vol. 4, nr. 8, 1921).
- FISCH. — Ueber das Verhalten der Zellkerne in fusionirenden Pilzen (V. deutsch. Naturf. und Aerzte in Strassburg, 1885).
- FOISTER (C.-E.). — The white tip disease of Leeks and its causal fungus, *Phytophthora Porri* (Transactions and proceedings of the Bot. Soc. of Edinburgh).
- FRANK (A.-B.). — Die Krankheiten der Pflanzen (2^e édit., p. 283, 1894).
- GAÜMANN (E.). — Ueber die Formen der *Peronospora parasitica* (These, Bern, 1927).
- GAÜMANN (E.) and DODGE (C.-W.). — Comparative morphology of fungi (Mc Graw-Hill, London, 6 and 8 Bouvene street E. C. 4, 1928).
- GAUTHERET (R.). — Sur la présence de lipides dans les vacuoles des plantules d'orge (C. R. Soc. Biol., CXVI, 1934).
- GIBELLI. — Primo rapporto sopra una nuova malattia del castagno (Gazetta Ufficiale, gennaio 1876, et Le Staz. Sper. Agr. It., nr. 16, 1876).
- Una nuova malattia dei castagni (Atti de R. Istit. Lomb. Sc. e Lett., 1876).
- Sopra una nuova malattia dei castagni (Acc. delle Sc. Modena, vol. XVIII, 1877).

- La malattia del castagno (Osservazioni ed esperienze 1875-1897). (Bull. del Comit. Agrario di Modena, 1879).
- Nuovi studi sulla malattia del castagno detta dell'inchiosastro. Nuovi studi e ricerche 1879-82 (Ann. del Min. di Agr., 1882).
- La malattia del castagno (L'Economia rurale, Torino, 1897, vol. 39, fasc. 6, p. 217).
- GILSON (E.-J.). — La cristallisation de la cellulose et la composition chimique de la membrane cellulaire végétale (La Cellule, Q. II, p. 337-441, 1893).
- GIODA (A.). — Si puo vincere il male dell'inchiestro (Il Coltivatore, nr. 25, p. 198, 1928).
- GRIFFON ET MAUBLANC. — Sur une maladie des perches du châtaignier (C. R. de l'Ac. des Sc., 1910, p. 1149).
- GUILLIERMOND (A.). — Recherche sur la structure de quelques champignons inférieurs (C. R. Acad. Sc., t. CXXXII, p. 175, 21 janvier 1901).
- Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures (Thèse de Doctorat ès Sciences, 1902).
- Recherches sur la karyokinèse des Ascomycètes (Rev. Gén. Bot., t. XVI, p. 129, 1904).
- Remarques sur l'évolution nucléaire et les mitoses de l'asque chez les Ascomycètes (C. R. Acad. Sc., p. 350, 2 août 1909).
- La sexualité chez les champignons (Bul. Sc. France et Belgique, t. XLIV, p. 110, 1910).
- Sur les mitochondries des cellules végétales (C. R. Acad. Sc., 17 juillet 1911, t. CLIII, p. 199).
- Sur la formation des chloroleucites aux dépens des mitochondries (C. R. Acad. Sc., t. CLIII, p. 290, 24 juillet 1911).
- Quelques remarques nouvelles sur le mode de formation de l'amidon dans la cellule végétale (C. R. Soc. Biol., t. LXXII, p. 276, 17 février 1912).
- Recherches sur le mode de formation de l'amidon et sur les plastides des végétaux (leuco, chloro et chromoplastes). Contribution à l'étude des mitochondries dans les Végétaux (Arch. d'Anat. microsc., t. XIV, p. 310, décembre 1912).
- Sur les mitochondries des champignons (C. R. Soc. Biol., t. LXXIV, p. 618, 15 mars 1913).
- Sur le rôle du chondriome dans l'élaboration des produits

- de réserve des champignons (C. R. Acad. Sc., t. CLVII, p. 63, 7 juillet 1913).
- État actuel de la question de l'évolution et du rôle physiologique des mitochondries d'après les travaux récents de Cytologie végétale (Rev. Gén. Bot., t. XXVI, p. 129, 1914).
 - Contribution à l'étude de la fixation du cytoplasme (C. R. Acad. Sc., t. CLXIV, p. 643, 23 avril 1917).
 - Sur l'origine des vacuoles dans les cellules de quelques racines (C. R. Soc. Biol., t. LXXXIII, p. 411, 27 mars 1920).
 - Observations cytologiques sur le cytoplasme d'un Saprolegnia (La Cellule, t. XXX, p. 356, 1920).
 - Nouvelles observations sur les Saprolegniacées (La Cellule, t. XXXII, p. 434-454, 1922).
 - Sur l'instabilité de forme et la permanence des mitochondries (C. R. Acad. Sc., t. CLXXX, 1925).
 - Sur l'action du rouge neutre sur les cellules végétales et sur la coloration vitale du vacuome (Bull. d'Hist. appl. à la Phys. et à la Path., t. IV, 1927).
 - La structure de la cellule végétale (Lyon Pharmaceutique, n° 14, p. 1-6, 1928).
 - Titres et travaux scientifiques (1900-1928) (Imp. Barnéoud, Laval, 1928).
 - A propos de l'appareil de Golgi dans les cellules végétales et sur la valeur des méthodes osmiques employées pour la différenciation de cet appareil (C. R. Soc. Biol., t. CL, p. 567, 15 juin 1929).
 - Sur le développement d'un Saprolegnia dans des milieux additionnés de colorants vitaux et la coloration vitale du vacuome pendant sa croissance (C. R. Acad. Sc., t. 188, p. 1621, 17 juin 1929).
 - Nouvelles observations ultramicroscopiques sur les cellules végétales et quelques vues sur la constitution physique du protoplasma (C. R. Sc. Biol., t. CI, p. 619, 22 juin 1929).
 - Sur la formation des zoosporanges et la germination des spores chez un Saprolegnia en culture sur milieux nutritifs additionnés de rouge neutre (C. R. Ac. Sc., t. 190, p. 384, 10 février 1930).
 - Culture d'un Saprolegnia en milieux nutritifs additionnés de rouge neutre. Valeur de la méthode de coloration vitale. (Bull. d'Histologie appl. à la Physiologie, t. VII, 7^e année, n° 4, p. 88 à 110, avril 1930).

- Sur la toxicité des colorants vitaux (C. R. Soc. Biol., t. CIV, p. 468, 31 mai 1930).
- Nouvelles recherches sur les caractères microchimiques et sur le mode de formation cytologique de pigments anthocyaniques (C. R. Ac. Sc., t. 192, p. 1581, 15 juin 1931).
- Sur le chondriome des Champignons (C. R. Soc. Biol., t. CV, 2, p. 1514, 18 juillet 1931).
- Sur certaines particularités cytologiques d'un *Saprolegnia* : dégénérescence mucilagineuse et production de sphérocristaux dans le suc vacuolaire (C. R. Soc. Biol., t. CXIV, p. 805, 30 juin 1934).
- Titres et travaux scientifiques (Supplém. 1928 à 1934) (Hermann et C^{ie}, éd., Paris, 1934).
- GUILLIERMOND (A.) ET GAUTHERET (R.). — Caractères microchimiques des composés oxyflavoniques, leur localisation dans les vacuoles (C. R. Acad. Sc., t. 196, p. 369, séance du 30 janvier 1933).
- GUILLIERMOND (A.), MANGENOT (G.), PLANTEFOL (L.). — Traité de Cytologie végétale (Le François, Paris, 1933).
- HARPER (R.-A.). — Sexual reproduction and organisation of the nucleus in certain Mildews (Carnegie Instit. of Washington, n° 37, oct. 1905).
- HARTIG (R.). — Der Buchenkeimpilz. Untersuchungen aus dem Forstbotanischen (Institut zu München, I, p. 33, 1880).
- HENRY. — La maladie des châtaigniers aux États-Unis et en Europe (Bull. Soc. Sc. de Nancy, 1909).
- HOLTERMANN (C.). — Mykologische Untersuchungen aus den Tropen (Berlin, 1898).
- ISTVANFFI. — Ueber die Rolle der Zellkerne bei der Entwicklung der Pilze (Ber. d. d. bot. Gesells., vol. XIII, 1895).
- JORGENSEN (A.). — Die Hefenfrage (Centralbl. f. Bakt. Par. und Inf., 2-te Abth., IV, 860, 1898).
- KAUFFMANN (C.-H.). — A contribution to the physiology of the *Saprolegniaceae* (Ann. of Bot., vol. 22, 1908).
- KIN CHOU TSANG. — Recherches cytologiques sur la famille des Péronosporées. Étude spéciale de la reproduction sexuelle (Le Botaniste, série XXI, 1929).
- KLÖCKER (A.) ET SCHIÖNNING (H.). — Phénomènes d'accroissement perforant et de formation anormale des conidies chez le *Dematium pullulans* de Bary, et autres champignons

- (Résumé du Compte rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg, 5^e volume, p. 47-58, 1900).
- KRUPKO. — Quelques observations vitales sur *Phytophthora Nicotianae* (C. R. Soc. Biol., t. CIII, 1930).
- LABROUSSE (F.) ET SAREJANNI (J.). — Changements de réaction et phénomènes d'oxydoréduction observés au cours du développement de quelques champignons (C. R. Ac. Sc., 12 novembre 1929, t. 189, p. 805).
- LAFFERTY (H.) and PETHYBRIDGE (G.-H.). — On a *Phytophthora parasitica* on Apples which has both amphigynous and paragynous antheridia and on allied species which show the same phenomenon (Scientif. Proceedings of the R. Dublin Soc., vol. XVII, 1922).
- LANGERON (M.). — Précis de Microscopie (Masson et C^{ie}, éd., Paris, 1934).
- LE GENDRE. — La maladie des châtaigniers (Ass. Franc. pour l'avanc. des Sc. Congrès d'Ajaccio, p. 986-991, 1901).
- LEONIAN (L.-H.). — Physiological studies on the genus *Phytophthora* (Amer. jour. of Bot., vol. XII, nr. 7, 1924).
- The effect of different hosts upon species of *Phytophthora* (Phytopathology, nr. 1, 1927).
- LESTER-SMITH (W.-C.). — Some observations on the oospores of *Phytophthora* species (Ann. of the Roy. Bot. Gard., Peradeniya; vol. X, part. 3, 1927).
- LEWITSKY (G.). — Ueber die Chondriosomen in pflanzlichen Zellen (Bericht, d. deutsch. Bot. Gesell., vol. 28, 1910).
- Die Chondriosomen als Secret-bildner (*Id.*, vol. 31, 1913).
- Ueber die Chondriosomen bei den Myxomyceten (Zeitschr. f. Botanik., 16^e année, 1924).
- LINDNER (P.). — Ueber Durchwachsungen in Pilzmycelien (Res. Travaux Carlsberg, vol. V, 153, 1887).
- LISON. — Étude sur l'histochemie des corps gras (Bull. d'histol. appl. à la physiol. et à la pathol., X, 1933).
- LUDWIG (L.-F.). — Ueber Alkoholgährung und Schleimfluss lebender Bäume und deren Urheber (Ber. d. deutschen Bot. Ges., IV, 17, 1886).
- LWOFF (A.). — Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires. Le pouvoir de synthèse (Monogr. de l'Inst. Pasteur, Masson, édit., 1932).
- MAGNUS (P.). — Ueber die Membrane der oosporen von Cys-

- topus *Tragopogonis* (Ber. d. deutsch. Gesellschaft, t. XI, 1893).
- MALINVAUD (M.). — La maladie de la brunissure (Bull. Soc. Bot. de France, t. XLV, série 3, 1898, p. 253).
- MANGENOT (G.). — Recherches sur le cytoplasme des Algues (Arch. Morphol. gén. et expér.) (Thèse de Doct. ès Sc. de Paris, 1921).
- État actuel de la question du chondriome (Bull. Hist. Appl. à la Physiol., 1926).
- MANGENOT (G.) ET EMBERGER. — Sur les mitochondries dans les cellules animales et végétales (C. R. Soc. Biol., mars 1920).
- MANGIN (L.). — Sur les réactifs iodés de la cellulose (Bull. de la Soc. Bot. de France, t. XXXV, p. 421, 1888).
- Sur la structure des Péronosporées (C. R. Ac. Sc., t. II, III, p. 923, 1890).
- Sur les réactifs colorants des substances fondamentales de la membrane (C. R. Ac. Sc., t. II, III, 1890).
- Sur la callose, nouvelle substance fondamentale existant dans les membranes des cellules des végétaux (C. R. Ac. Sc., t. I, p. 644, 1890).
- Recherches sur la distribution des composés pectiques chez les végétaux (Jour. Bot., p. 189, 1891).
- Sur la désarticulation des conidies des Péronosporées (Bull. de la Soc. Bot., t. XXXVII, 1891).
- Propriétés et réactions des composés pectiques (Jour. de Bot., 1891).
- Observations sur les membranes cellulosiques (C. R. Ac. Sc., 113, p. 1069, 1891).
- Observations sur la présence de la callose chez les phanérogames (Bull. Soc. Bot. de France, 39, p. 260, 1892).
- Sur l'emploi du rouge de ruthenium en anatomie végétale (C. R. Ac. Sc., 116, p. 653, 1893).
- Observations sur la constitution de la membrane chez les champignons (C. R. Ac. Sc., t. II, 117, p. 816, 1893).
- Recherches anatomiques sur les Péronosporées (Bul. Soc. d'Hist. Nat. d'Autun, VIII, p. 56, 1895).
- Réponse aux Abonnés (Journ. d'Agriculture Pratique, 28 août 1902).
- Sur la maladie du châtaignier causée par le *Mycelophagus Castaneae* (C. R. Acc. de Sc., 1903).

- Le Châtaignier et sa crise (Rev. de la Viticulture, 1904).
- Nouvelles observations sur la callose (C. R. Ac. Sc., 151, 279, 1910).
- Le châtaignier et sa crise (Conférence, Limoges, Impr. Ducourtieux et Gont, 1910).
- Introduction à l'étude des mycorhizes des arbres forestiers (Nouvelles Archives du Muséum, 3^e sér., II, 1910).
- Maladie du châtaignier (Ann. des Epiphyties, 1912-1914).
- MAURIZIO (A.). — Zur Entwicklungsgeschichte und Systematik der Saprolegnieen (Flora oder Allg. Bot. Munchen, 1894).
- MEVES (Fr.). — Ueber das Vorkommen von Mitochondrien beziehungsweise Chondriomiten in Pflanzenzellen (Ber. der deutschen Botanisch. Ges., t. XXII, p. 284-286, 1904).
- MILOVIDOV (M.-P.-F.). — Coloration différentielle des bactéries et chondriosomes. Sur les méthodes de double coloration du chondriome et des grains d'amidon. Arch. Anat. micr., t. XXIV, n^o 1, 1928).
- Observations vitales sur l'altération du chondriome chez le Saprolegnia sous l'influence de divers facteurs externes (Rev. Gén. Bot., t. XLI, 1929).
- MIYAKE. — The fertilisation of Pythium de Baryanum (Ann. of Botany, vol. XV, 1901).
- MOLISCH (H.). — Mikrochemie der Pflanzen (Iéna, 1913).
- MURPHY (P.-A.). — The morphology and cytology of the sexual organs of Phytophthora erythroseptica, Pethybr. (Annals of Botany, vol. XXXII, nr. CXXV, Jan. 1918, p. 115).
- The Bionomics of the conidia of Phytophthora infestans (Mont) de Bary (The Scient. Proceedings of the Royal Dublin Soc. n, s, vol. XVI, p. 442, 1922).
- NARDI (R.). — Sur la constitution chimique de la membrane cellulaire des champignons (Bull. Soc. Mycol. de France, t. XLVII, 1931).
- OSTERWALDER (A.). — Das Absterben von Veredlungen verursacht durch Phytophthora omnivora de Bary (Ber. Schweiz. Versuchsanstalt Vädenswil, Landwirt. Jahrb. der Schweiz, p. 321, 1912).
- OWAWA. — A propos des fixateurs du chondriome (Note préliminaire) (Rev. Gén. Bot., t. XXXIX, 1927, p. 218-232).

- PEGLION. — La malattia crittogamiche delle piante coltivate (3-a édit. 1912, p. 531-43).
- PETHYBRIDGE (G.-H.). — Further observation on *Phytophthora erythroseptica* Pethybr. and on the disease produced by it in the potato plant (The Sc. Proc. of the Royal Dublin Soc., vol. XIV, nr. 10, 1914).
- PETHYBRIDGE (G.-H.) and LAFFERTY (H.-A.). — A disease of tomato and other plants caused by a new species of *Phytophthora* (The Scient. Proc. of Royal Dublin Soc., vol. XV, nr. 35, 1919).
- PETHYBRIDGE (G.-H.) and MURPHY (P.-A.). — On pure cultures of *Phytophthora infestans* de Bary and the development of oospores (The scient. Proceedings of the Royal Dublin Society, vol. XIII, nr. 36, 1913).
- PETRI (L.). — Nuove osservazioni sulla biologia e sul parasitismo della *Blepharospora cambivora* (Ann. R. Ist. Sup. For. Naz., vol. IX, 1924).
- Esperienze sul grado di resistenza del Castagno giapponese alla *Blepharospora cambivora* (Ann. R. Ist. Sup. For. Naz., vol. IX, 1924).
 - Istruzioni pratiche per riconoscere e combattere la malattia del castagno detta dell'inchiostro (Nuovi An. dell'Agric., IV, 2, 1924).
 - Osservazioni biologiche sulla *Blepharospora cambivora* (An. R. Ist. Sup. Agar. For., sér. 2-A., vol. I, 1925).
 - Studi sulla malattia del castagno detta dell' inchiostro (An. R. Ist. Sup. For., II, 1927).
 - Di un nuove metodo di cura del mal dell'inchiostro del castagno (Bol. R. Straz. di Patholog. Veg. di Roma, an VIII, 1928).
 - Il grado di resistenza della varieta selvatiche di *Castanea vesca*-Gärtn, al mal dell'inchiostro (Bol. R. Staz. Patholog. Veg. di Roma, an IX, 1929).
 - La formazione degli organi della riproduzione sessuale della *Phytophthora* (*Blepharospora*) *cambivora* in coltura pura (Bol. R. Staz. Pathol. Veg. di Roma, an X, 1930).
 - Il me todo d'isolamento della *Phytophthora cambivora* (Bol. R. Staz. Pathol. Veg. di Roma, an XI, 1931).
- PETTER (M^{lle}). — La réaction nucléale de Feulgen chez quelques végétaux inférieurs (C. R. Ac. Sc., t. 197, p. 88, 1933).

- PLANCHON (M. J. E.). — La maladie des châtaigniers (C. R. Acad. Sc., p. 583, 1879).
- La maladie des châtaigniers (Bul. Soc. Bot. de France, p. 17, 13 janvier 1882).
- PONTILLON (G.). — Contribution à l'étude physiologique des Lipides du *Sterigmarocystis nigra* (Thèse de Paris, 1932).
- PRÉVOST (B.). — Mémoires sur la cause immédiate de la carie (p. 33-35, Montauban, 1807).
- PRILLIEUX (E.). — Germination des zoospores du *Peronospora viticola* (Bul. de la Soc. Bot., t. XXX, p. 183-228, 1883).
- Maladies des plantes agricoles et des arbres fruitiers et forestiers causées par des parasites végétaux (T. I, Paris, 1895).
- PRINGSHEIM (N.). — Weitere Nachträge zur Morphologie und Systematik der Saprolegniaceen (Pringsh. Jahrb. f. wissensch. Bot., 191, 1873-1874).
- PRUNET (A.). — Sur la résistance du châtaignier du Japon à la maladie de l'encre (C. R. Acad. Sc., CXLIX, p. 1146, 1909).
- PY-HUREL (M^{me}). — Recherches cytologiques sur l'assise nourricière des microspores et les microspores des plantes vasculaire (Librairie Générale de l'enseignement, Paris, 1932).
- Sur un procédé permettant d'obtenir la cristallisation des composés oxyflavoniques dans les vacuoles (C. R. Soc. Biol., t. CXII, p. 1191, 1933).
- Sur certains caractères de coloration des tanins dans la vacuole et sur l'existence supposée de complexes tanins mucilages (C. R. Soc. Biol., t. CXII, p. 1622, 1933).
- REILHES. — Effet de la concentration de l'iode sur la coloration de l'amidon (Rev. gén. Bot., 1931).
- RICHTER (K. I.). — Beiträge zur genaueren Kenntnis der chemischen Beschaffenheit der Zellenmembranen beiden Pflanzen (Sitzber. Wiener Akad., 83, I, 494, 1881).
- ROSEBAUM (J.). — Studies of the genus *Phytophthora* (Journ. Agr. Res., 8, 1917).
- ROSENBERG. — Ueber die Befruchtung von *Plasmopara alpina* (Bih. Till. K. Svenska Vet. Akad. Handl., vol. 28, 1903).

- ROSTAFINSKI (J.). — Beobachtung über Paarung von Schwärmsporen (Bot. Zeitung, 1871).
- ROZINDO MONIZ DA MAIA. — Um novo Oomyceta parasita de arvores do genero Citrus (Rev. Agronomica, 1924).
- RUHLAND. — Die Befruchtung der Albugo Lepigoni und einiger Peronosporen (Hedwigia, vol. XLI, 1902, communication préliminaire).
- Studien über die Befruchtung der Albugo Lepigoni und einiger Peronosporen (Jahr. f. Wiss., Botanik., vol. XXXIX, 1904).
- SACCARDO (P.-A.). — Sylloge Fungorum omnium hucusque cognitorum (vol. VII, IX, XVI, 1888).
- SAKSENA. — Observations sur le chondriome de Pythium de Baryanum de Hesse (C. R. Soc. Biol., t. CXI, 75, 1932).
- SALVI (G.). — Il mal dell'Inchiostro (L'Agricoltura Italiana, 1900).
- SARGENT (Ch.). — Cupuliferae Salicacae (Silva, IX, 1896).
- SCHLEIDEN. — Grundzüge der wissenschaftlichen Botanik (4 Aufl, Leipzig, 1861).
- SCHMIDT (A.). — Ueber die Bedingungen der Conidien, Gemmen- und Schlauchfruchtproduktionen bei Sterigmatocystis nidulans (Eid. Inaugural Dissert., Halle, 1897).
- SCHNEIDER. — Illustriertes Handbuch der Laubholzkunde (I, 1906, p. 156).
- SILVA DI GRAGLIA. — Memoria per servire allo studio della malattia dei castagni (Movimento Biellese, Biella, Chiarino, 1872).
- SEYNES (J. de). — Sur la maladie des Châtaigniers (C. R. Ac. Sc., 6-I-1879).
- Le parasite de la maladie du châtaignier (Ass. franç. pour l'avanc. des Sc. — Congrès de Montpellier, 8 sept. 1879).
- De la maladie des châtaigniers appelée maladie de l'encre (Comice Agric. de l'Arrondiss. du Vigan, séance 10 sept. 1889).
- SHARP. — Introduction to Cytology (seconde édition, 1926).
- SHERBAKOFF (C.-D.). — Buckeye rot of tomato fruits (Phytopathology, 7, 1917).
- SMITH (Erwin. F.). — Bacteria in relation to plant disease (vol. I, II, III. Carnegie of Washington, D. C. déc. 1905).
- SMITH (E.-H.). — Pythiacystis infection of deciduous nursery Stoch (Phytopathology, 5, 1915).

- SMITH (R.-E.). — The brown rot of lemon (Calif. Agric. Exper. Sta. Bul., 190, 1907).
- SORAUER (P.). — Handbuch der Pflanzenkrankheiten (III, Aufl., I, Bd., p. 210-219-702, 1908).
- STEVENS (H.-E.). — The compound oosphere of *Albugo Bliti* (Bot. Gazette, vol. XXVIII, 1899).
- Gametogenesis and fertilisation in *Albugo* (Bot. Gazette, v. XXXII, 1901).
- Studies in the fertilisation of *Phycomycetes* (Bot. Gazette, vol. XXXIV, 1902).
- Citrus diseases (Florida Agric. Exper. Sta. Rpt., 1913; 17-10-R, 11-R, 1918).
- SZYMANEK (J.). — Contribution à l'étude du *Phytophthora infestans* (Extr. des Annales des Epiphyties, 13^e ann., n^o 4, 1927).
- TSEN CHENG. — Sur les modifications histopathologiques contractées chez la Pomme de Terre (*Solanum tuberosum*) atteinte de dégénérescence (Maladie de l'enroulement). (C. R. Acad. Sc., 1928).
- Sur les phénomènes de nécrose observés dans la Pomme de Terre atteinte d'enroulement (C. R. Acad. Sc., 1928).
- TUCKER (C.). — Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary (Univ. of Missouri College of Agric., Agric. Exper. Sta. Resear. Bull., 153, p. 147, 1931).
- The distribution of the genus *Phytophthora* (Univ. of Missouri College of Agric., Agric. Exper. Sta. Resear. Bull., 184, March 1933).
- UPPAL. — Relation of oxygen to spore germination in some species of the *Peronosporales* (Phytopathology, vol. 16, nr. 1926).
- Toxicity of organic compounds to the spores of *Phytophthora colocassiae* Rac. (Journ. Agric. Res., 1926).
- VOLKONSKY (M.). — Culture de *Saprolegnia* en milieu synthétique. Son alimentation sulfurée (C. R. de la Soc. de Biol., 20 février 1932, p. 528).
- Sur les conditions de culture et le pouvoir de synthèse de *Saprolegnia*. Etude qualitative de l'alimentation carbonée, azotée et sulfurée (Ann. de l'Inst. Pasteur. Mai 1933, p. 703).
- Sur la nutrition de quelques champignons saprophytes et parasites (Ann. de l'Inst. Pasteur. Janvier 1934, p. 76).

- Utilisation de différentes combinaisons du soufre par *Saprolegnia* (C. R. de la Soc. de Biol., 27 février 1932, p. 614).
- Un nouveau procédé de purification des cultures de champignons Oomycètes (C. R. Soc. de Biol., 1933, p. 1657).
- Sur l'assimilation des sulfates par les champignons. Euthiotrophie et parathiotrophie (C. R. Acad. Sc., 20 octobre 1933, p. 712).
- VOUK (V.-J.). — Zur Kenntnis der mikrochemischen Chitinreaktionen (Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. Bd., 33, p. 443, 1915).
- Wager. — On the nuclei of *Peronospora Parasitica* (Annals of Botany, vol. IV, 1889).
- Observations on the structure of *Cystopus candidus* (Brit. Ass. Reports, 1892).
- On the structure and reproduction of *Cystopus candidus* (Ann. of Botany, vol. X, 1896).
- The sexuality of Fungi (Ann. of Botany, vol. XIII, 1899).
- On the fertilisation of *Peronospora parasitica* (Annals of Botany, vol. XIV, 1900).
- WELEMINSKY (F.). — Ueber Sporenbildung bei *Dematium pullulans* de Bary (Res. Com. Ren. des Travaux du Labor. de Carlsberg, vol. V, 297, 1899).
- WETTSTEIN (F.-V.). — Das Vorkommen von Chitin und seine Verwertung als systemphylogenetisches Merkmal im Pflanzenreiche (Sitzber. Akad. d. Wiss. Wien, 1921).
- WILSON (G.-W.). — Studies in North-American Peromospores. II. Phytophthorae and Physothecae (Bul. of the Torrey Bot. Club., vol. XXXIV, nr. 8, 1907).
- WINTERSTEIN (E.-J.). — Zur Kenntnis der Pilzcellulose (Ber. d. deutsch. Bot. Ges. Bd., II, S. 441, 1893).
- WISSELINGH (C.-V.). — Sur la cuticularisation et la cutine (Arch. Néerl. de scienc. exactes nat. Harlem, t. XXVIII, p. 373, 1895).
- Mikrochemische Untersuchungen über die Zellwände der Fungi (Fahrb. für Wissensch. Bot., 31, 629, 1898).
- Ueber die Anwendung der in der organischen Chemie gebräuchlichen Reaktionen bei den phytomikrochemischen Untersuchungen (Folia microbiologia, Bd 3, Hft 3, 1915).
- ZALEWSKI. — Ueber Sporenabschnürung und Sporenbildung bei den Pilzen (Flora, XII, 1883).

- Zur Kenntnis der Gattung *Cystopus* (Bot. Centralbl., vol. XV, 1883).
- ZOPF (W.). — Die Pilze in morphologischer, biologischer, physiologischer und systematischer Beziehung (Breslau, 1890).
- ZWEIBAUM (J.). — Sur l'utilisation du mélange « Nadi » et du bleu d'Indophénol formé in vitro en technique histologique (C. R. de la Soc. de Biol., 1923).
- Sur la coloration des graisses dans la cellule vivante (C. R. de la Soc. de Biol., 1923).
- ZWEIBAUM (J.) ET MANGENOT. — Application à l'étude histochimique des végétaux d'une méthode permettant la coloration vitale et postvitale des graisses dans la cellule animale (Soc. de Biol. de Lyon, 1923).

PLANCHE I

Les graisses ne sont représentées que sur quelques figures.

- FIG. 1. — Mycélium élargi.
- FIG. 2. — Bourgeonnements de filaments.
- FIG. 3. — Mycélium palmé.
- FIG. 4. — Mycélium verticillé.
- FIG. 5-6. — Mycélium formant des ampoules riches en graisses.
- FIG. 7. — Corps intercalaire né sur un thalle normal.
- FIG. 8. — Renflement apical ayant l'aspect d'une conidie.
- FIG. 9. — Germination d'un renflement.
- FIG. 10. — Conidies successives.
- Fig. 11-12. — Conidies en germination directe.

PLANCHE I

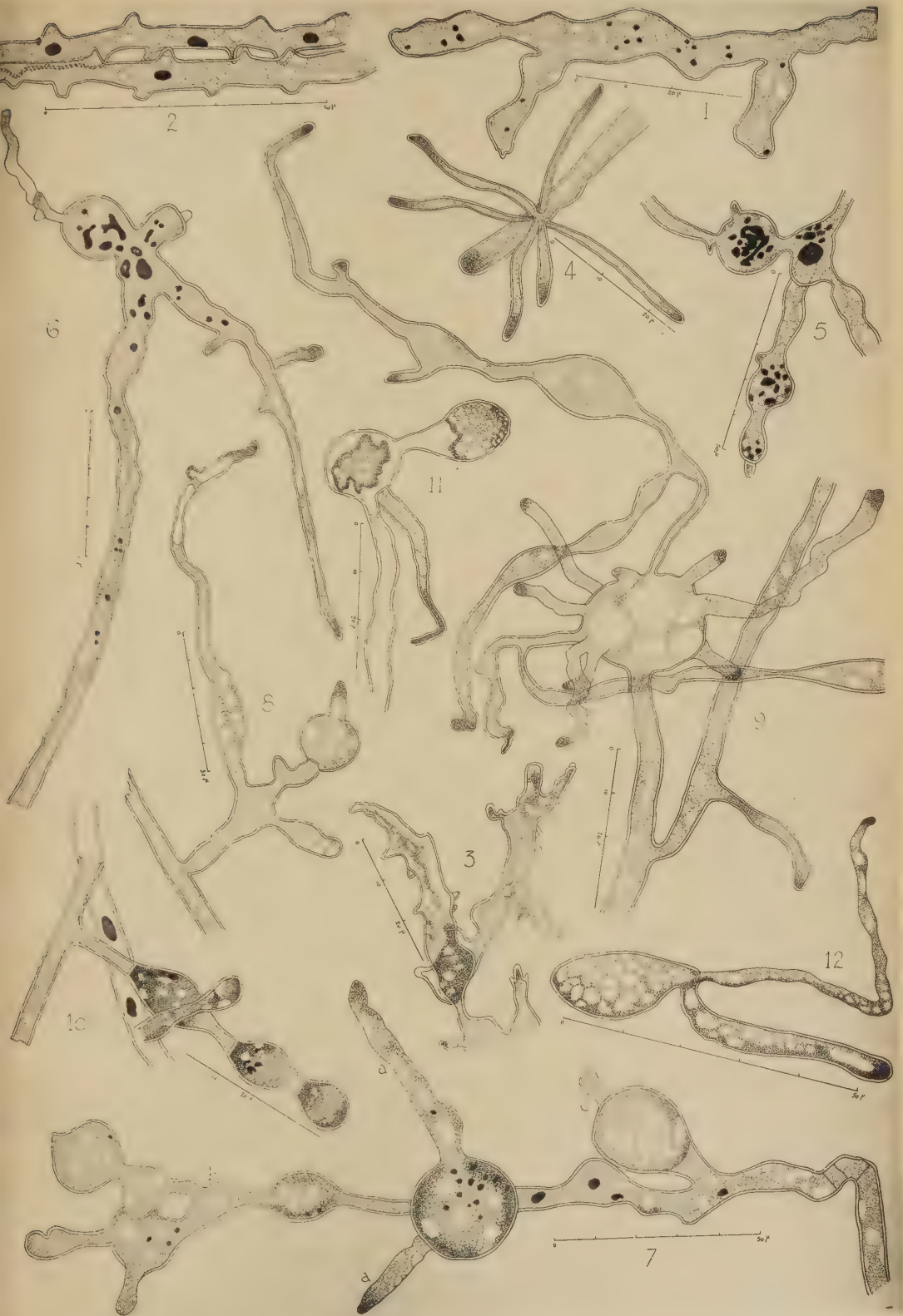


PLANCHE II

Les graisses ne sont représentées que sur quelques figures.

- FIG. 1. — Cloisons diverses.
- FIG. 2. — Petite conidie à l'extrémité d'un filament vide.
- FIG. 3. — Conidies sessiles.
- FIG. 4. — Conidie sessile secondaire.
- FIG. 5-6. — Germinations de conidies.
- FIG. 7. — Germination du sporangiophore au point d'attache du sporange.
- FIG. 8-9. — Germinations diverses du sporange.
- FIG. 10. — Expulsion du protoplasme sans germination.
- FIG. 11. — Le sporangiophore, après avoir donné naissance à un sporange, continue son développement.
- FIG. 12. — Le sporangiophore se prolonge en un tube germinatif qui traverse le sporange.

PLANCHE II



PLANCHE III

Les graisses ne sont représentées que sur quelques figures.

- FIG. 1. — Deux sporanges emboîtés l'un dans l'autre.
FIG. 2-3. — Sporange secondaire à l'intérieur d'un sporange primaire.
FIG. 4. — Germination d'une conidie sessile donnant naissance à un sporange.
FIG. 5. — Très long sporangiophore secondaire à l'extrémité duquel se trouve une conidie.
FIG. 6. — Ébauche d'une conidie secondaire formée à l'intérieur du sporange primaire.
FIG. 7. — Spores à l'intérieur du sporange.
FIG. 8. — Sporange ayant donné naissance à des spores jumelées.
FIG. 9. — Germination d'une spore encore située dans le sporange.
FIG. 10 *a-b-c-d*. — Spores de formes différentes suivant leur âge.
FIG. 11. — Grosses vacuoles dans des spores non encore libérées.

PLANCHE III

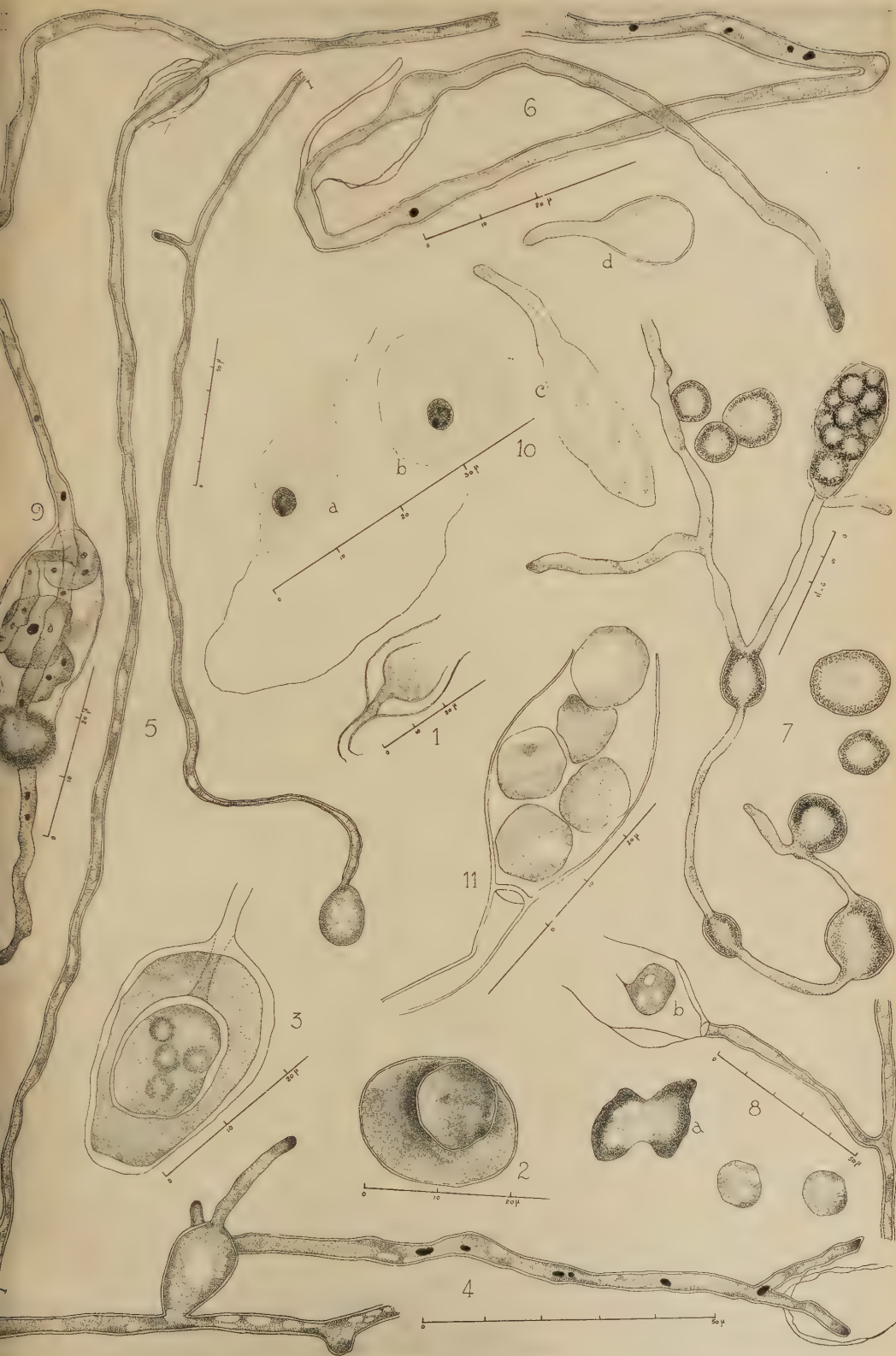


PLANCHE IV

Les graisses ne sont représentées que sur quelques figures.

- FIG. 1-2. — Accroissement perforant à travers une ou plusieurs cloisons.
- FIG. 3-4. — Perforation de la paroi mycélienne.
- FIG. 5. — Rupture longitudinale de la membrane.
- FIG. 6-7-8. — Individualisation de particules protoplasmiques.
- FIG. 9-10. — Germination de ces particules à travers les membranes du mycélium.
- FIG. 11. — Germination à l'intérieur du thalle.
- FIG. 12-13. — Germination après expulsion du thalle.
- FIG. 14. — Plage de nature graisseuse à l'intérieur d'un filament.

PLANCHE IV

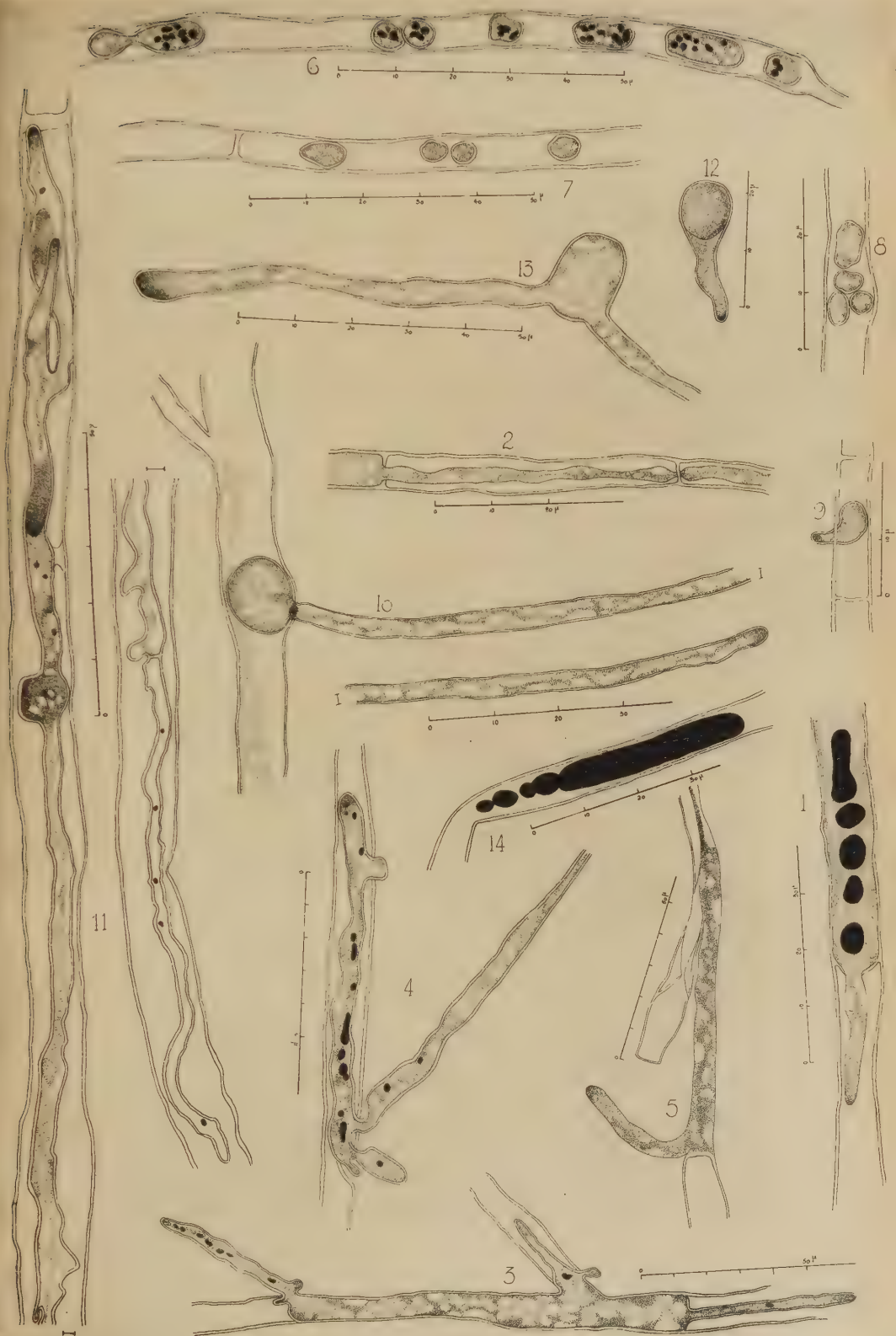


PLANCHE V

Les graisses sont représentées en noir.

- FIG. 1. — Dissociation lamellaire des parois épaissies d'un renflement après traitement par un acide concentré.
- FIG. 2. — Épaississement provoquant une obturation entre le canal mycélien et un renflement.
- FIG. 3. — Mycélium épaissi sur une partie de sa longueur et normal au delà d'une cloison.
- FIG. 4. — Bourgeonnement d'un corps intercalaire épaissi ayant pris naissance sur un mycélium normal.
- FIG. 5. — Renflements successifs à membranes épaissies.
- FIG. 6. — Corps individualisés à parois épaissies.
- FIG. 7. — Germination d'un corps intercalaire à membrane épaissie.
- FIG. 8. — Épaississement mycélien analogue à celui de la figure 2.

PLANCHE V

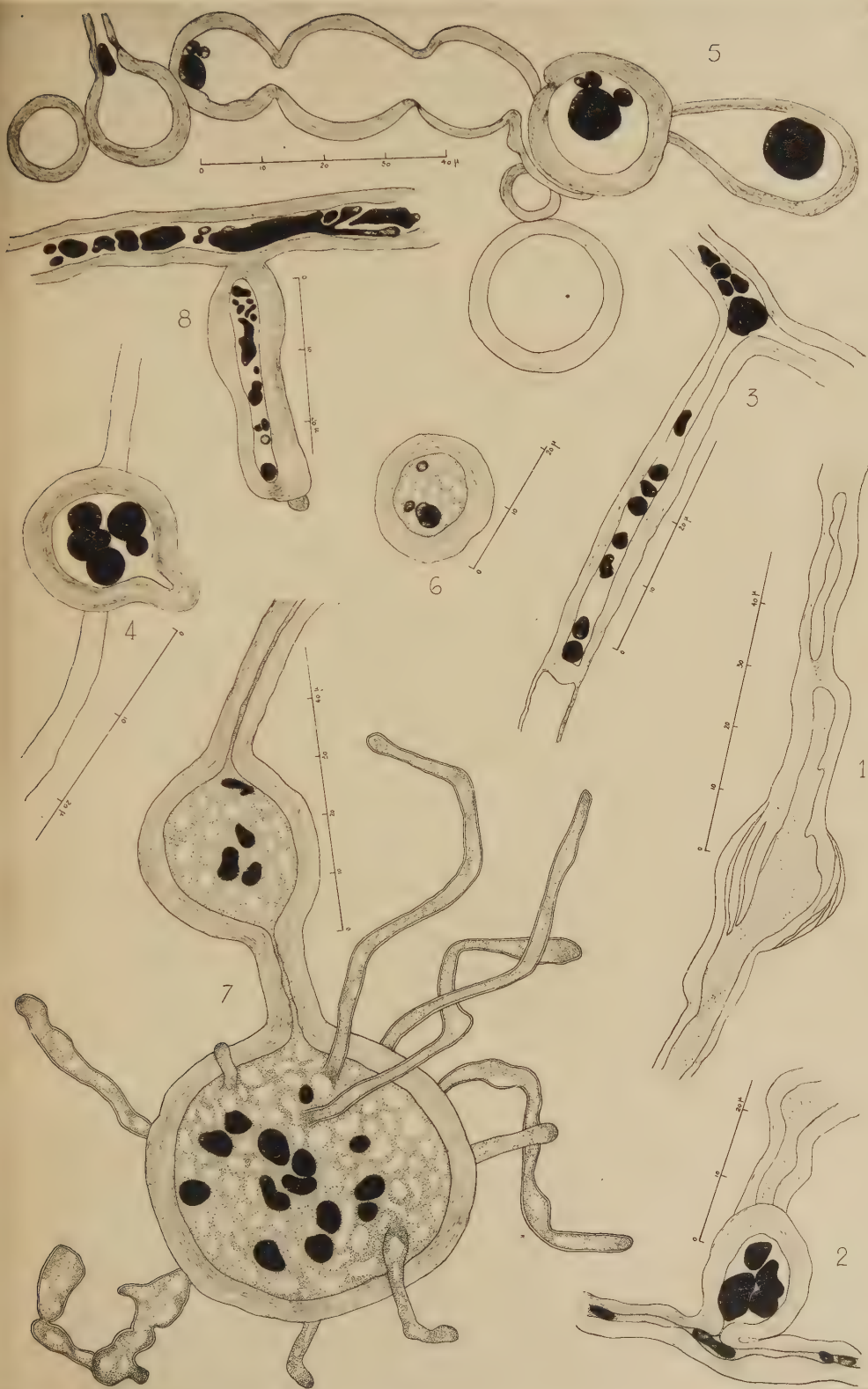


PLANCHE VI

Les noyaux sont représentés en gris foncé, les graisses en noir.

- FIG. 1. — Oogone supposé dans une cellule de châtaignier.
- FIG. 2. — Oogone supposé dans une cellule de chêne.
- FIG. 3. — Œuf à anthéridie amphigyne.
- FIG. 4. — Œuf sans anthéridie, peut-être parthénogénétique.
- FIG. 5. — Œuf à anthéridie paragyne (?).
- FIG. 6. — Œuf à grande anthéridie et à oosphère de dimensions réduites.
- FIG. 7. — Deux œufs à l'intérieur d'une même exospore.
- FIG. 8. — Œuf sur lequel le tube fécondateur est visible.
- FIG. 9. — Coupe d'un œuf en germination.
- FIG. 10. — Germination d'un œuf — observation directe.
- FIG. 11. — L'oogonophore a germé comme dans le cas de la figure précédente, mais le filament est rompu au niveau de la paroi anthéridienne.

PLANCHE VI

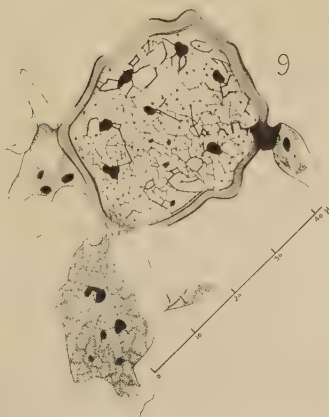
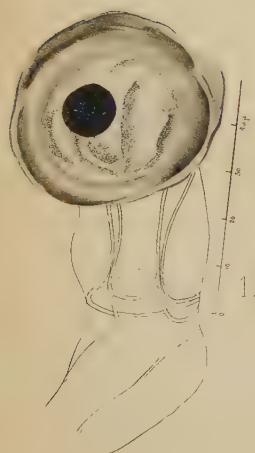
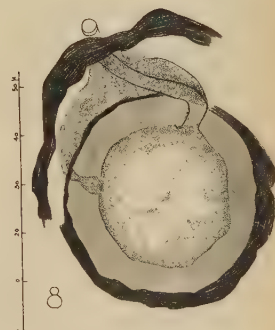
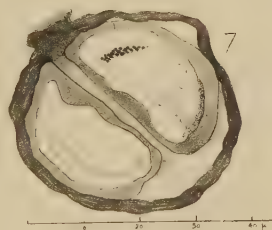
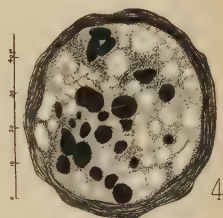
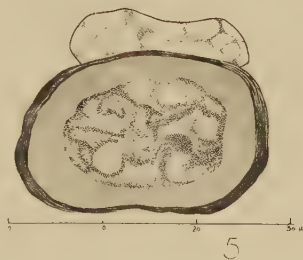
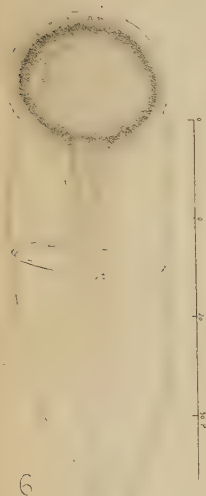
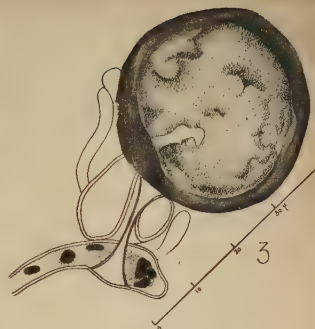
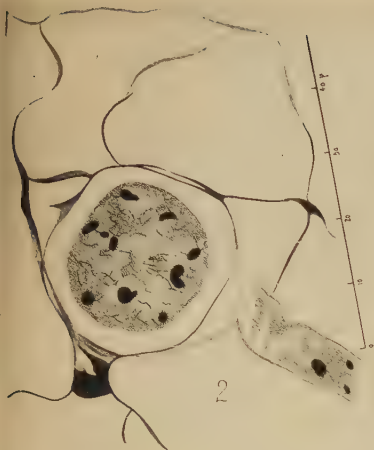


PLANCHE VII

- FIG. 1. — Chondriome coloré vitalement par le violet de dahlia.
 FIG. 2. — Structure mitochondriale normale.
 FIG. 3. — Mitochondries granuleuses.
 FIG. 4. — Mitochondries vésiculisées.
 FIG. 5. — Chondriome d'un sporange.
 FIG. 6. — Chondriome d'une zoospore.
 FIG. 7. — Divers états d'altérations cytologiques dans des renflements (a-b-c-d-) mycéliens.
 FIG. 8. — Disposition des noyaux dans un filament très jeune.
 FIG. 9. — Noyaux quiescents dans un mycélium plus âgé.
 FIG. 10. — Division directe de noyaux.
 FIG. 11. — Stades de division nucléaire.
 FIG. 12. — Division nucléaire dans un sporange.
 FIG. 13. — Nombreux noyaux dans un sporange.
 FIG. 14. — Cloisonnement d'un jeune sporange.
 FIG. 15. — Différenciation de protoplasme en spores à l'intérieur d'un sporange.
 FIG. 16. — Structure globuleuse de vacuoles à l'extrémité d'un thalle.
 FIG. 17. — Structure filamenteuse de vacuoles dans une partie du thalle plus éloignée de l'extrémité.
 FIG. 18. — Coalescence des vacuoles filamenteuses.
 FIG. 19. — Grande vacuole dans une conidie.
 FIG. 20. — Fins globules de graisses dans un mycélium.
 FIG. 21. — Structure cytologique dans un mycélium, mise en évidence par une double coloration.
 FIG. 22. — Gouttes graisseuses entourées d'une auréole de liquide vacuolaire.

PLANCHE VII

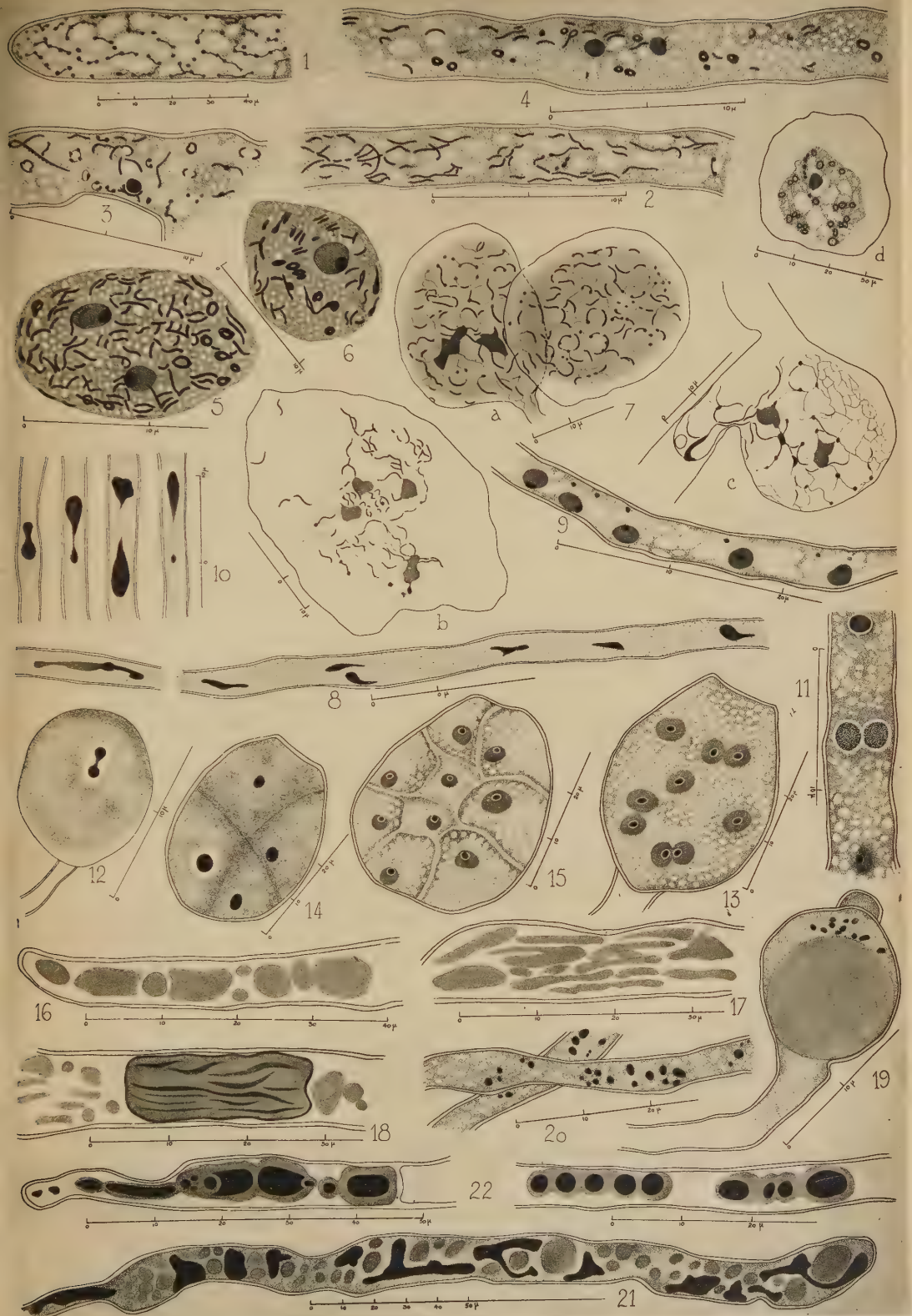


PLANCHE VIII

Fixation : Meves-Coloration : Hématoxyline ferrique.

- FIG. 1. — Oogone.
- FIG. 2. — Nombreux noyaux dans un oogone.
- FIG. 3-4-5. — Disposition des noyaux dans l'anthéridie.
- FIG. 6. — Anthéridie coupée transversalement.
- FIG. 7-8. — Vacuome.
- FIG. 9. — Distinction entre le périplasme et l'ooplasmе.
- FIG. 10. — Cœnocentre et noyaux périphériques.
- FIG. 11. — Noyaux périphériques.
- FIG. 12-13. — Phase finale de la première division nucléaire.
- FIG. 14-15. — Différents aspects du cœnocentre.

PLANCHE VIII

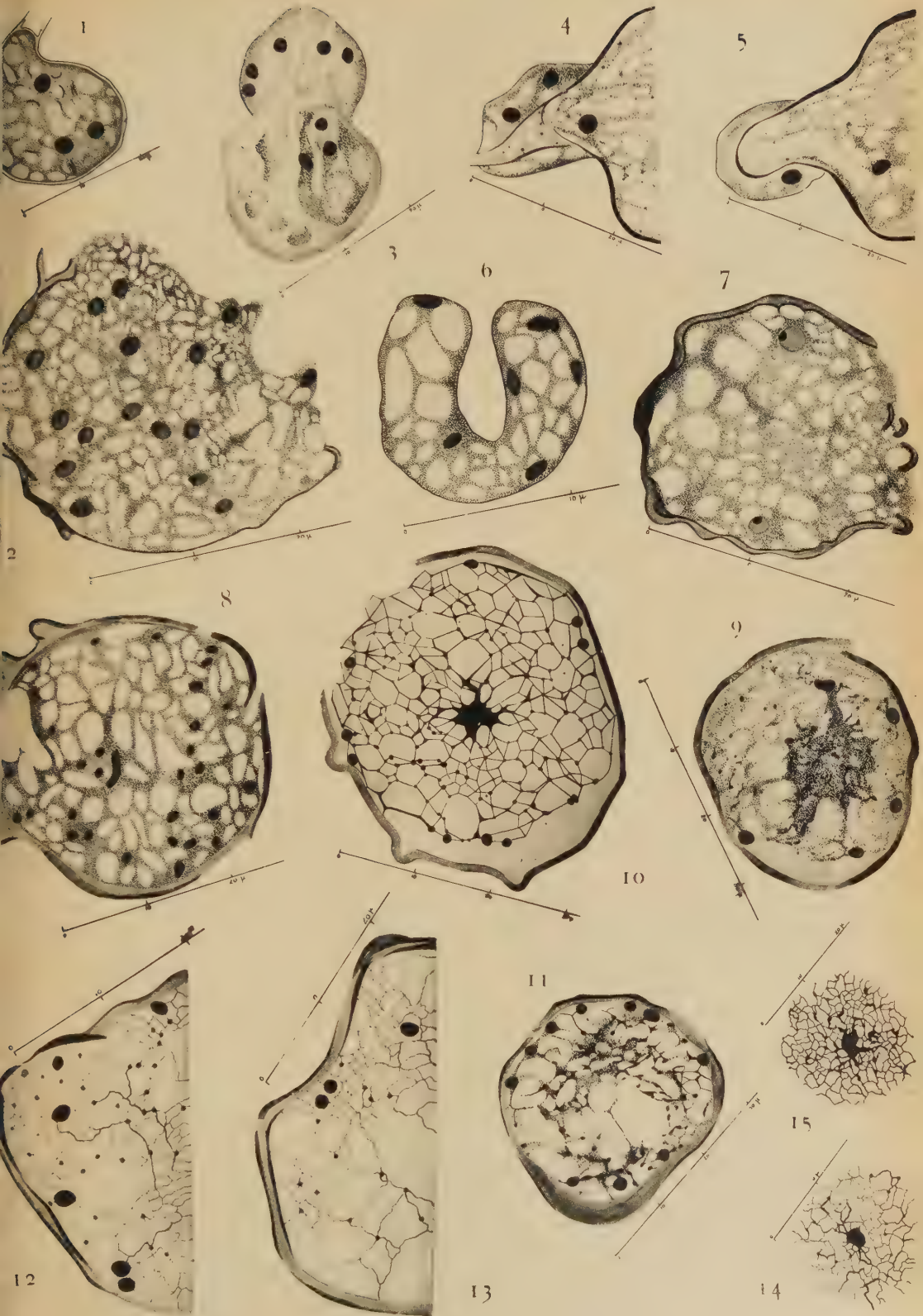


PLANCHE IX

- FIG. 1 à 9 incluse et fig. 11 et 12. — Fixation :
Meves-Coloration Hématoxylène ferrique.
FIG. 10. — Fixation : Meves-Coloration : Strasburger.
FIG. 13. — Fixation : Stevens-Coloration : Strasburger.

- FIG. 1. — Deuxième mitose.
FIG. 2. — Noyau femelle accroché au cœnocentre.
FIG. 3. — Disposition périphérique des noyaux dans l'anthéridie.
FIG. 4. — Aspect cytologique de l'oosphère et de l'anthéridie.
FIG. 5-6-7. — Différents aspects du tube fécondateur.
FIG. 8. — Noyaux mâle et femelle en voie de rapprochement; le reliquat du tube fécondateur est visible.
FIG. 9. — Noyaux mâle et femelle en présence.
FIG. 10. — Fusion des noyaux mâle et femelle.
FIG. 11. — Noyau de fusion.
FIG. 12. — Noyau de fusion au stade de la prophase (?).
FIG. 13. — Œuf en dégénérescence.

PLANCHE IX

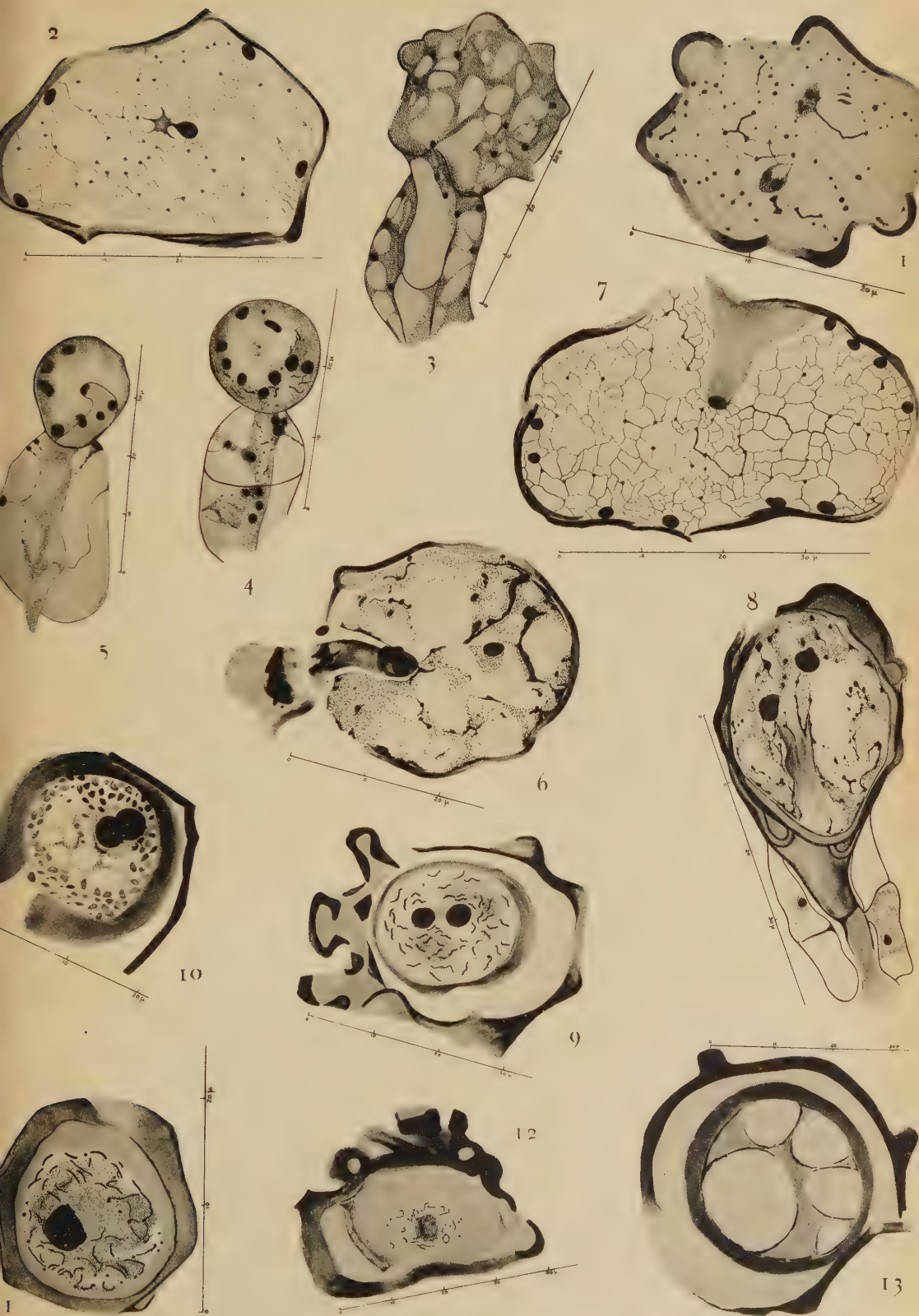


PLANCHE X

- FIG. 1. — Calotte d'exospore colorée en noir par l'hémaloxyline ferrique.
Coloration de fond : erythrosine.
- FIG. 2. — Coupe transversale d'une calotte d'exospore.
- FIG. 3. — Réactions microchimiques au chloroiodure de zinc et au soudan III.
- FIG. 4-5. — Réactions microchimiques au bleu C4B et au soudan III.
- FIG. 6. — Coloration des échinules de l'exospore par le bleu C4B.
- FIG. 7. — Coloration différentielle des échinules et de l'endospore par le bleu C4B et le soudan III.
- FIG. 8. — Coloration de l'exospore par le rouge de ruthénium.

PLANCHE X

Fig. 3

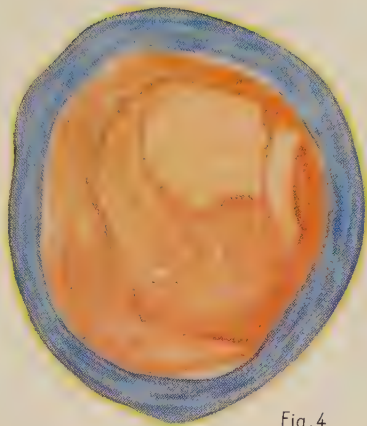
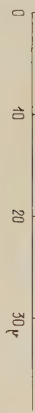
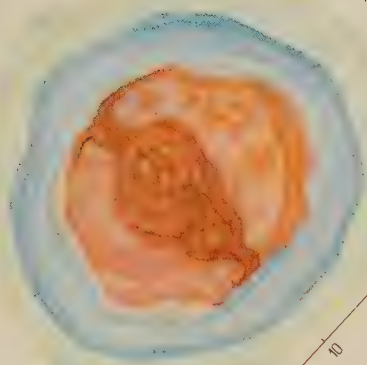


Fig. 4

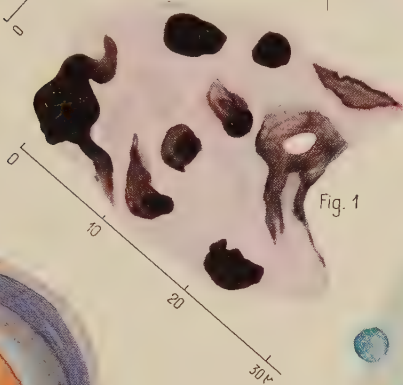


Fig. 1

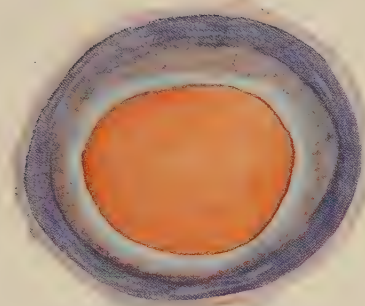


Fig. 5

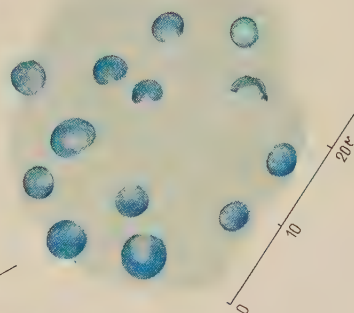


Fig. 6

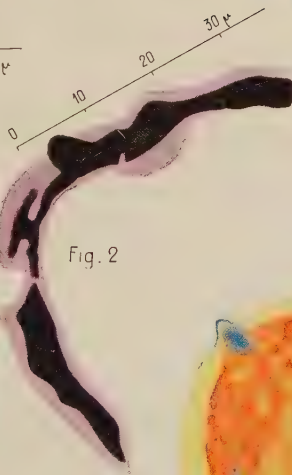


Fig. 2

Fig. 8

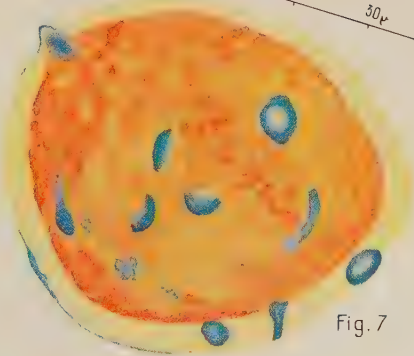
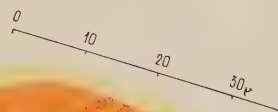
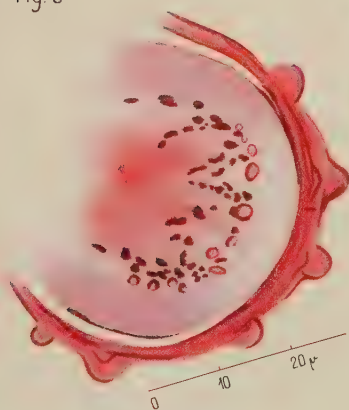


Fig. 7

PLANCHE XI

- FIG. 1. — Invagination mycélienne dans une cellule de châtaignier.
- FIG. 2. — Invagination mycélienne en « a »; perforation de la cellule en « b ». (Fixation au Regaud-Coloration à la fuchsine acide et au vert lumière.)
- FIG. 3. — Envahissement par le *Phytophthora cambivora* des cellules de l'axe hypocotylé de châtaignier. (Fixation au Regaud-Coloration à la Fuchsine acide et au vert lumière.)
- FIG. 4. — Renflement dans l'axe hypocotylé de lupin.
- FIG. 5. — Étranglement du mycélium au passage d'une cellule dans la cellule voisine.
- FIG. 6 et 7. — Incrustation du mycélium dans le corps de la cellule.
- FIG. 8 — Dissociation de la cuticule par les filaments mycéliens.
- FIG. 9 et 10. — Perforation de la cuticule par le mycélium qui s'échappe au dehors.

PLANCHE XI



PLANCHE XII

(Coupes effectuées dans le châtaignier).

FIG. 1 à 4 et 6 à 8. — Fixation au Regaud-Coloration à la fuchsine acide et au vert lumière.

FIG. 5. — Fixation au Regaud-Coloration à l'hématoxyline.

FIG. 1. — Cellules saines dans les tissus cotylédonaire.

FIG. 2. — Cellule saine dans la même région; grains d'amidon très nombreux.

FIG. 3. — Chondriome des cellules cotylédonaire infectées.

FIG. 4. — Composés taniques dans les cellules saines de l'axe hypocotylé.

FIG. 5. — Chondriome ponctiforme des cellules infectées de l'axe hypocotylé.

FIG. 6. — Nombreux grains d'amidon dans une cellule saine de la racine; grosse vacuole remplie de tanin.

FIG. 7. — Chondriome ponctiforme dans une cellule saine de la racine.

FIG. 8. — Structure mitochondriale dans une cellule infectée de la racine.

PLANCHE XII

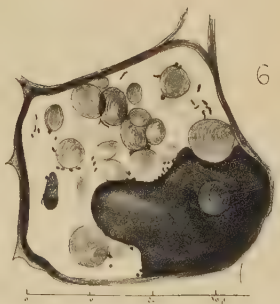
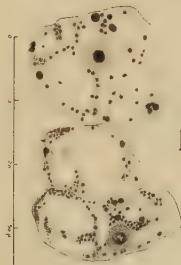
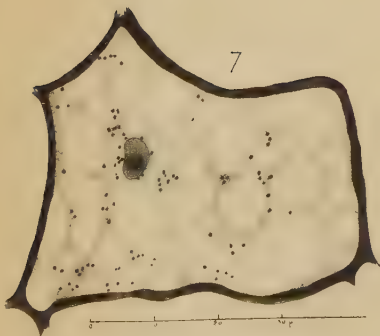
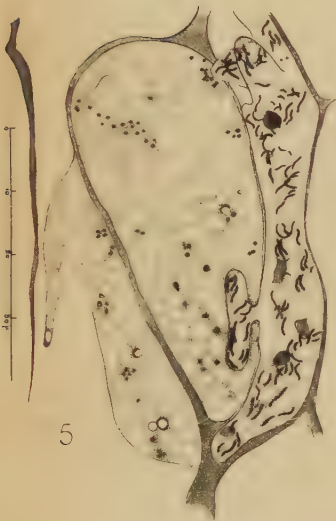
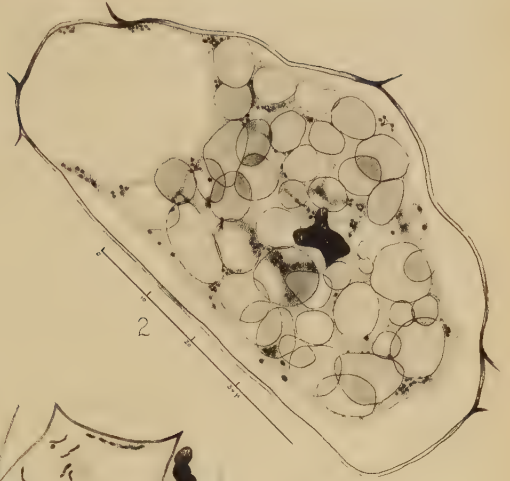
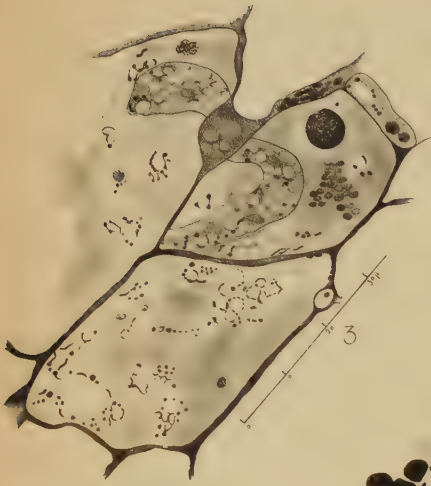


PLANCHE XIII

(Coupes effectuées dans le lupin).

- FIG. 1. — Composés phénoliques dans les cellules cotylédonaire infectées (Fixation au Regaud-Coloration à l'hématoxyline).
- FIG. 2. — Régression des chloroplastes; passage de la forme polygonale à la forme arrondie (Fixation au Regaud-Coloration à la fuchsine acide et au vert lumière).
- FIG. 3. — Mitochondries filamenteuses et mitochondries en état de différenciation en plastes (Fixation au Flemming fort-Coloration à la fuchsine acide et au vert lumière).
- FIG. 4 et 5. — Corpuscules lipoidiques dans une cellule saine d'axe hypocotylé (Fixation au Flemming fort-Coloration à la fuchsine acide et au vert lumière).
- FIG. 6. — Invagination et pénétration du mycélium dans diverses cellules de l'axe hypocotylé (Fixation au Nemec-Coloration à la fuchsine acide et au vert lumière).
- FIG. 7. — Chondriome ponctiforme dans les cellules de l'axe hypocotylé (Fixation au Nemec-Coloration à la fuchsine acide et au vert lumière).
- FIG. 8. — Corpuscules lipoidiques et chondriome dans une cellule saine de la racine (Fixation au Flemming fort-Coloration à la fuchsine acide et au vert lumière).
- FIG. 9. — Différenciation du chondriome en amyloplastés dans une cellule de racine saine (Fixation au Flemming fort-Coloration à la fuchsine acide et au vert lumière).
- FIG. 10. — Chondriome ponctiforme dans une cellule altérée de la racine (Fixation au Regaud-Coloration à l'hématoxyline).
- FIG. 11. — Différents états de l'altération des noyaux (*a, b, c, d, e, f* : Fixation au Flemming fort-Coloration à la fuchsine acide et au vert lumière; *g*, Fixation au Regaud-Coloration à l'Altmann-Küll).

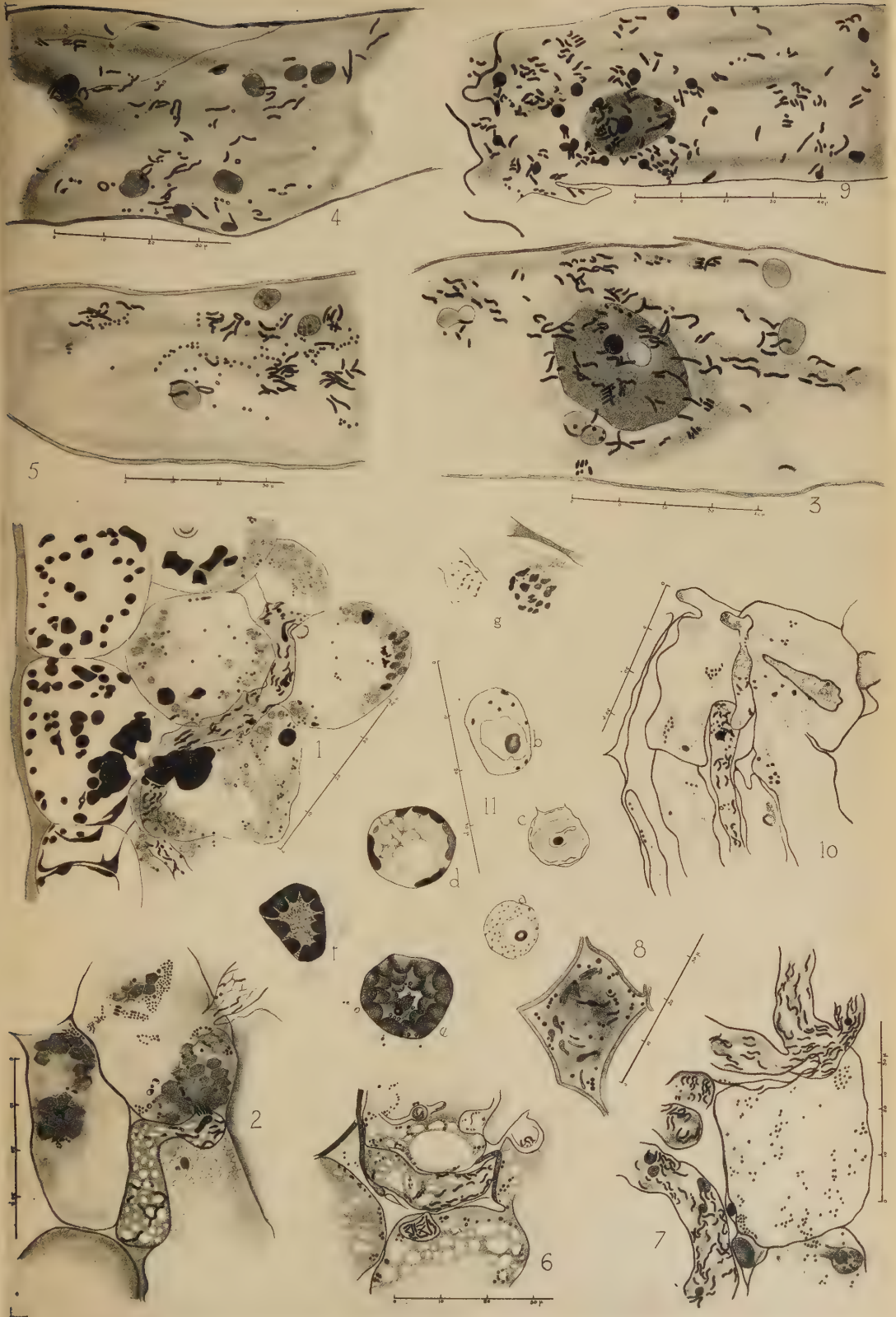


PLANCHE XIV

- FIG. 1. — Corps intercalaires obtenus en milieu de Petri gelosé. $D = 570$.
FIG. 2. — Œufs ayant pris naissance sur même milieu. $D = 45$.
FIG. 3. — Œuf orné de protubérances. $D = 1.000$.
FIG. 4. — Œuf à anthéridie amphigyne pourvu d'une cloison. $D = 1.500$.
FIG. 5. — Différenciation des organes sexuels (perforation du thalle mâle par le thalle femelle). $D = 1.500$.

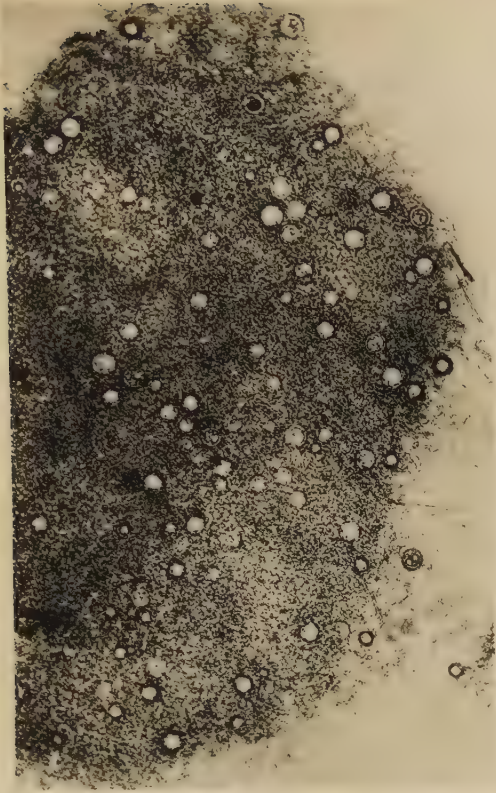


Fig. 2.

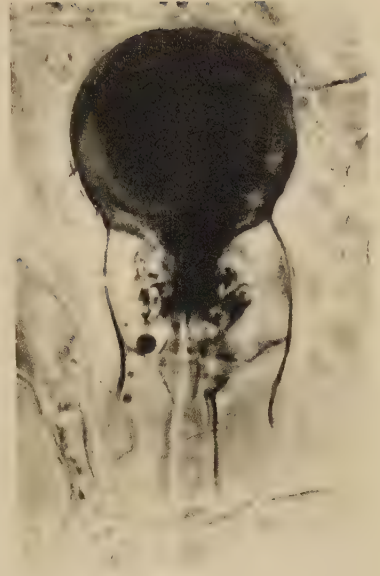


Fig. 4.

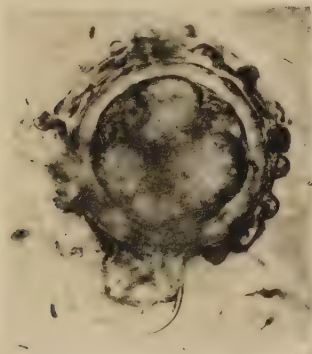


Fig. 3.



Fig. 5.

Fig. 1.

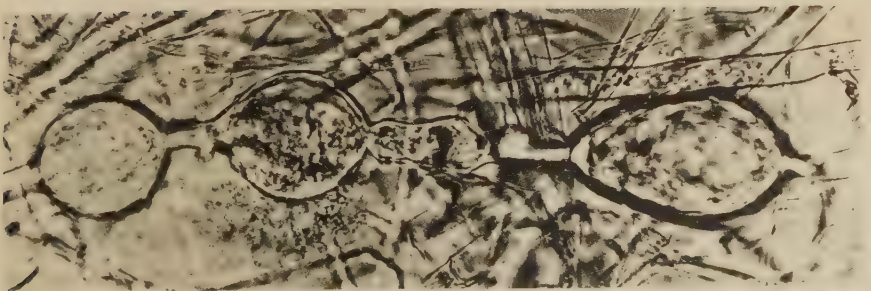


PLANCHE XV

FIG. 1 et 2. — Paysages de Corrèze : châtaigneraies dévastées par la maladie de l'encre à MALEMORT près BRIVE-LA-GAILLARDE.



FIG. 1



FIG. 2

PLANCHE XVI

- FIG. 1. — Axe hypocotylé de châtaignier inoculé expérimentalement.
Exsudation de tanin en « a ».
- FIG. 2. — Châtaignier centenaire atteint de la maladie de l'encre à MALE-
MORT (Corrèze).

PLANCHE XVI



Fig. 1.



Fig. 2.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LES CHAMPIGNONS PARASITES DE L'HOMME

VU ET APPROUVÉ

Paris, le 18 juillet 1935

Le Doyen de la Faculté des Sciences

CH. MAURAIN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Recteur de l'Académie de Paris

S. CHARLÉTY

